Klassische Synthesen von Thymopoietin (32-36) und Thymosin ß9 (18-29)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

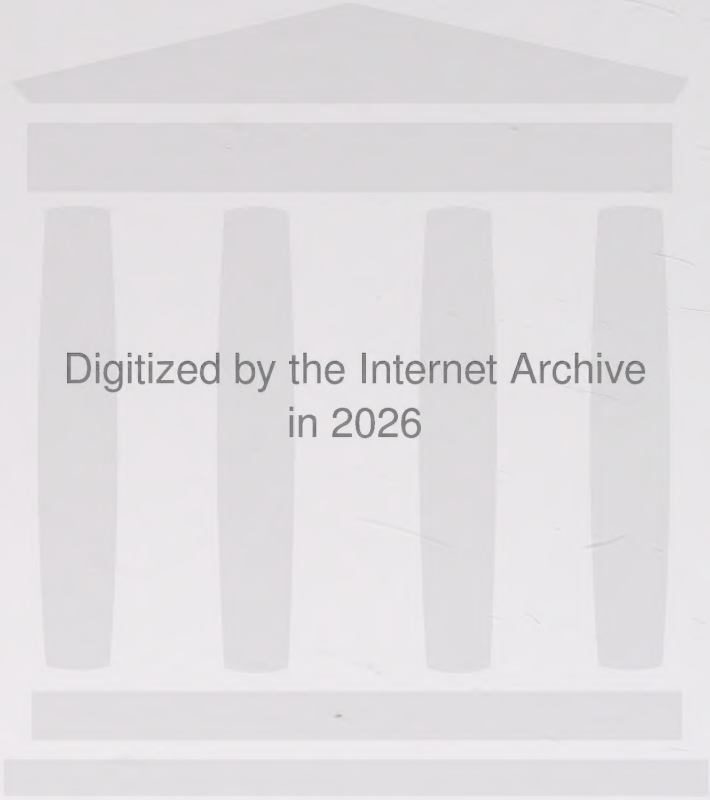
vorgelegt von

Wolfgang Heinzel

aus Tailfingen

1983

83 350


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0031

Klassische Synthesen von Thymopoietin (32-36) und Thymosin β9 (18-29)

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Heinzel

aus Tailfingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1983

Dekan:	Prof. Dr. Joachim Strähle
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Wolfgang Voelter
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Ernst Bayer

Abstract

H e i n z e l, Wolfgang

Klassische Synthesen von Thymopoietin (32-36) und Thymosin ß9 (18-29)

Verschiedene klassische Synthesen der Thymuspeptide Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36) und Thymopoietin (32-36) werden beschrieben. Von dem in seiner Primärstruktur bekannten Thymosin ß9 wird zum ersten Mal eine Partialsequenz synthetisiert.

Zur Darstellung der Thymopoietinderivate werden mehrere Synthesewege eingeschlagen, um eine Optimierung bezüglich Ausbeute, Reinigung und Synthesedauer zu erzielen. Von den in der Arbeit eingeschlagenen Synthesestrategien führt der Aufbau nach Schema 5 unter den genannten Aspekten zu den besten Ergebnissen.

Zur Synthese von Thymosin ß9 (18-29) werden zunächst die einzelnen Fragmente schrittweise vom C-terminalen Ende her aufgebaut. Danach wird das Fragment 25-29 (H-Lys(Boc)-Asn-Thr-(Bu^t)-Leu-Pro-OH) in einer Azidkupplung nach Honzl-Rudinger mit dem Fragment 22-24 (Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3) zum geschützten Octapeptid verknüpft. Nach Entfernen der Z-Gruppe wird wiederum in einer Azidkupplung das geschützte Dodecapeptid durch Umsetzung des Fragments 18-21 (Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3) mit dem Octapeptid dargestellt. Die Abspaltung sämtlicher Schutzgruppen gelingt mit konzentrierter Trifluoressigsäure.

Sämtliche dargestellten Peptide werden bezüglich ihres Einflusses auf menschliche Tumorzellen getestet. Die vorläufigen Ergebnisse dieses Tests zeigen, daß sämtliche synthetisierten Peptide in diesem Testsystem biologisch inaktiv sind.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Voelter

in der Zeit vom Dezember 1980 bis März 1983 im Institut für Organische Chemie und im Institut für Physiologische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. W. Voelter danke ich sehr für die interessante Themenstellung, sein stetes Interesse und die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. E. Bayer danke ich für die bereitwillige Überlassung von Institutseinrichtungen.

Folgenden Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für die Aufnahme zahlreicher Spektren möchte ich Herrn Bartholomä (FD-MS), Herrn Dr. W. Fuchs (13-C-NMR) und Frl. Förstel (IR) danken.
Herrn Dr. T. Stiefel sei für die Durchführung der biologischen Aktivitätsuntersuchungen und Herrn Dr. T. Kronbach für die hochdruckflüssigkeitschromatographischen Untersuchungen gedankt. Frl. U. Töpfer danke ich sehr für die sorgfältige Durchführung präparativer Arbeiten im Labor.
Frau Munari sei für die Durchführung der Aminosäureanalysen, Herrn Dipl.-Chem. J. Gerhardt für die Durchführung der Racemattests und Frau E. Seifried für die sorgfältig durchgeführten Elementaranalysen gedankt.
Besonderen Dank schulde ich Frau I. Wildermuth für die Anfertigung des Manuskripts.

Irrtümer haben ihren Wert;
Jedoch nur hie und da.
Nicht jeder, der nach Indien fährt,
Entdeckt Amerika.

(E. Kästner)

Für Marga, Christoph und Kristin

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

AAK	Autoantikörper
Adpoc	1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl
Boc	tert.-Butyloxycarbonyl
Bu^t	tert.-Butyl
c-AMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimid
DCHA	Dicyclohexylammonium(salz)
Ddz	α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl
DMF	Dimethylformamid
EE	Essigsäureethylester
FD-MS	Felddesorptions-Massenspektrometrie
FTS	Facteur Thymique Serique
GvH	Graft versus Host
HAc	Essigsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HOSu	N-Hydroxysuccinimid
MAF	Macrophage activating factor
Mbs	p-Methoxybenzosulfonyl
MCF	Macrophage cytotoxic factor
MeOH	Methanol
MIF	Migration inhibiting factor
MLC	Mixed-Lymphocyte-culture
PID	Primärer Immundefekt
SF	Serumfaktor
SID	Sekundärer Immundefekt
TdT	terminale Desoxynucleotidyltransferase
TFA	Trifluoressigsäure
TF 5	Thymosin-Fraktion 5
THF	Humoraler Thymusfaktor
TS	Thymostimulin
Z	Benzyloxycarbonyl

Die Abkürzungen für Aminosäuren entsprechen denen der IUPAC-IUB-Nomenklatur-Kommission: Eur. J. Biochem. 27, 201 (1972); 74, 1 (1977)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Der Thymus	1
2.	Das Immunsystem	2
3.	Immundefekte	6
4.	Thymuspeptide	7
4. 1.	Thymosin-Fraktion 5	7
4. 2.	Thymosin α1	8
4. 3.	Thymosin ß1	8
4. 4.	Thymosin ß4	8
4. 5.	Thymosin ß8 und Thymosin ß9	8
4. 6.	Facteur Thymique Serique	9
4. 7.	Humoraler Thymusfaktor	9
4. 8.	Thymostimulin	10
4. 9.	Serumfaktor	10
4.10.	Thymon A, B und C	10
4.11.	Thymopoietin I, II und III	10
III.	THEMENSTELLUNG	12
IV.	SPEZIELLER TEIL	13
1.	Überlegungen zur Syntheseplanung von Thymopoietin (32-36)	13
2.	Synthese von Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36) und Thymopoietin (32-36)	14
2.1.	Syntheseweg 1 und 2	14
2.2.	Syntheseweg 3	17
2.3.	Syntheseweg 4	18
2.4.	Syntheseweg 5	23
2.5.	Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung der Thymopoietinfragmente	26
3.	Überlegungen zur Synthese von Thymosin ß9 (18-29)	29
3.1.	Synthese von Thymosin ß9 (18-29)	30
3.1.1.	H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe (Fragment 25-29)	30
3.1.2.	Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3 (Fragment 22-24)	35

		Seite
3.1.3.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3 (Fragment 18-29)	37
3.1.4.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	40
3.1.5.	Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung von Thymosin ß9 (18-29)	41
3.2.	Synthese von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe (geschütztes Thymosin ß9 (18-29))	42
3.2.1.	H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe (Fragment 25-29)	42
3.2.2.	Darstellung von geschütztem Thymosin ß9 (18-29)	45
4.	Biologische Aktivitätsuntersuchungen	47
V.	EXPERIMENTELLER TEIL	49
1.	Spektroskopische Methoden	49
1.1.	Kernresonanzspektroskopie	49
1.2.	Massenspektrometrie	49
1.3.	Drehwerte	49
1.4.	Infrarotspektroskopie	49
2.	Chromatographische Methoden	50
3.	Sonstiges	50
4.	Chemikalien	51
5.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t (Syntheseweg 1)	52
5.1.	H-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl	52
5.1.1.1.	Tyr-OMe·HCl	52
5.1.1.2.	Z-Tyr-OMe	52
5.1.1.3.	Tyr-OEt·HCl	52
5.1.1.4.	Z-Tyr-OEt	53
5.1.2.	Z-Tyr-OH	53
5.1.3.	H-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl	53
5.2.	Z-Val-OH	54
5.3.	Z-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	55
5.3.1.	H-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl	55
5.4.	Z-Asp(OBu^t)-OH·DCHA	56
5.4.1.	Z-Asp-OH	56
5.4.2.	Z-Asp$\overline{\text{-O}}$	56

		Seite
5.4.3.	Z-Asp-α-ONb	57
5.4.4.	Z-Asp(ß-OBu^t)-α-ONb	57
5.4.5.	Z-Asp(ß-OBu^t)-OH·DCHA	57
5.5.	Z-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	58
5.5.1.	H-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl	59
5.6.	Z-Lys(Boc)-OH·DCHA	59
5.6.1.	H-Lys(Bal)-OH	59
5.6.2.	Z-Lys-OH	60
5.6.3.	Z-Lys(Boc)-OH·DCHA	60
5.7.	Z-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	61
5.7.1.	H-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl	62
5.8.	Z-Arg(Mbs)-OH·DCHA	62
5.8.1.	Z-Arg-OH	62
5.8.2.	Z-Arg(Mbs)-OH·DCHA	62
5.9.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	63
6.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t (Syntheseweg 2)	64
6.1.	Z-Val-OSu	64
6.2.	Z-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	64
6.2.1.	H-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	65
6.3.	Z-Asp(ß-OBu^t)-OSu	65
6.4.	Z-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	65
6.4.1.	H-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	66
6.5.	Z-Lys(Boc)-OSu	66
6.6.	Z-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	67
6.6.1.	H-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl	67
6.7.	Z-Arg(Mbs)-OSu	68
6.8.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	68
7.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	69
7.1.	H-Lys(Boc)-OH	69
7.2.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-OH	69
7.3.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	70
8.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	71

		Seite
8.1.	Ddz-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	71
8.1.1.	Ddz-Val-OH·DCHA	71
8.1.2.	Ddz-Val-OSu	71
8.1.3.	Ddz-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	72
8.2.	H-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA	73
8.3.	Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	73
8.3.1.	Adpoc-Val-OH	73
8.3.2.	Adpoc-Val-OSu	74
8.3.3.	Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	74
8.4.	H-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA	75
8.5.	Adpoc-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	76
8.5.1.	Adpoc-Lys(Boc)-OH	76
8.5.2.	Adpoc-Lys(Boc)-OSu	78
8.5.3.	Adpoc-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	78
8.6.	H-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA	79
8.7.	Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t	80
9.	Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	81
9.1.	Z-Val-Tyr-OBu^t	81
9.1.1.	H-Val-Tyr-OBu^t	81
9.2.	Z-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	82
9.2.1.	H-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t·HCl	82
9.3.	Z-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	83
9.4.	Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp(ß-OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	83
10.	Darstellung von Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36) und Thymopoietin (32-36)	84
10.1.	Thymopoietin (34-36)	84
10.2.	Thymopoietin (33-36)	85
10.3.	Thymopoietin (32-36)	86
11.	Synthese von Thymosin ß9 (18-29)	88
11.1.	H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH (Fragment 25-29)	88
11.1.1.	H-Pro-OMe·HCl	88
11.1.2.	Adpoc-Leu-OH	88
11.1.3.	Adpoc-Leu-Pro-OMe	89
11.1.4.	H-Leu-Pro-OMe·HCl	89
11.1.5.	H-Thr-OMe	90
11.1.6.	Z-Thr-OMe	90

		Seite
11.1. 7.	Z-Thr(Bu^t)-OMe	91
11.1. 8.	Z-Thr(Bu^t)-OH·DCHA	91
11.1. 9.	Z-Thr(Bu^t)-OSu	91
11.1.10.	Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	92
11.1.11.	Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	93
11.1.12.	Z-Asn-OH	93
11.1.13.	Z-Asn-ONp	93
11.1.14.	Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	94
11.1.15.	H-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH·HCl	95
11.1.16.	Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	95
11.1.17.	H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH·HCl	96
11.2.	Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3 (Fragment 21-23)	96
11.2. 1.	Z-Glu-OH	96
11.2. 2.	Z-Glu-O	97
11.2. 3.	Z-Glu-OMe	97
11.2. 4.	Z-Glu(OBu^t)-OMe	97
11.2. 5.	H-Glu(OBu^t)-OMe·HCl	98
11.2. 6.	Z-Gln-OH	98
11.2. 7.	Z-Gln-ONp	98
11.2. 8.	Z-Gln-Glu(OBu^t)-OMe	99
11.2. 9.	H-Gln-Glu(OBu^t)-OMe·HCl	99
11.2.10.	Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-OMe	100
11.2.11.	Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3	100
11.3.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3 (Fragment 18-21)	101
11.3.1.	Z-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe	101
11.3.2.	Z-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe	102
11.3.3.	H-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe·HCl	102
11.3.4.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe	103
11.3.5.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3	103
11.4.	Darstellung von Thymosin β9 (18-29)	104
11.4.1.	Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	104
11.4.2.	H-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	105
11.4.3.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	106
11.4.4.	Thymosin β9 (18-29)	106

		Seite
12.	Darstellung von geschütztem Thymosin β9 (18-29)	108
12.1.	H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe·HCl (Fragment 25-29)	108
12.1.1.	H-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	108
12.1.2.	Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	109
12.1.3.	Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	109
12.1.4.	H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe·HCl	110
12.2.	Adpoc-Lys (Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	111
12.2.1.	Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	111
12.2.2.	H-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe·HCl	112
12.2.3.	Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	112
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	114
VII.	LITERATUR	116

I. EINLEITUNG

Eine gestörte Funktion des Thymus führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen, einer verstärkten Neigung zu Autoimmunerkrankungen und zu einem erhöhten Krebsrisiko. Als endokrine Drüse sezerniert der Thymus in den epithelialen Thymuszellen Hormone, welche die Differenzierung zu immunologisch kompetenten T-Lymphocyten bewirken[1, 2]. Damit stellt sich die Frage, ob bei reduzierter Thymusfunktion, durch therapeutische Gaben von Thymushormonen, das geschwächte Immunabwehrsystem wieder aktivierbar ist. Die erste isolierte Peptidfraktion aus Kalbsthymus (Thymosinfraktion 5) zeigt sowohl im in vivo- als auch im in vitro-System biologische Aktivität[3]. Aufgrund dieser Tatsache wird die Isolierung weiterer Thymushormone vorangetrieben, um die vielen, noch unbekannten Zusammenhänge, welche den Thymus und das Immunsystem betreffen, aufzuklären.

II. ALLGEMEINER TEIL

II. 1. Der Thymus

Der Thymus ist ein zweilappiges, primäres lymphatisches Organ im vorderen Mediastinum, welches sich als erstes im Verlauf der Ontogenese entwickelt hat. Während der Fetalperiode und in den ersten Lebensjahren nimmt er laufend an Gewicht zu und erreicht in der frühen Pubertät ein Maximum; dann kommt es zu einer fortschreitenden, aber nie vollständigen Involution des lymphatischen Gewebes. Bis in unsere heutige Zeit wurde der Thymus als degeneriertes Organ der Evolution betrachtet. Erst 1961 konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen[4-11] nachgewiesen werden, daß dem Thymus eine zentrale Bedeutung in bezug auf ein intaktes Immunsystem zukommt.

Neonatale Thymektomie bei Mäusen, welche bei der Geburt immunologisch noch relativ unreif sind, führt zu folgenden Erscheinungen: Die Zahl der im Blut zirkulierenden Lymphocyten und

die Fähigkeit Transplantate abzustoßen sind deutlich herabgesetzt; die Fähigkeit, Antikörper gegenüber zahlreichen Antigenen zu produzieren, ist ebenfalls stark beeinträchtigt. Die Mäuse nehmen an Gewicht ab (Kümmerwuchs), altern vorzeitig und überleben aufgrund der Unfähigkeit, Infektionen wirksam zu bekämpfen, die ersten Monate nicht (Wasting Syndrom). Adul thymektomierte sowie keimfrei gehaltene neonatal thymektomier Mäuse zeigen kein Wasting. Neonatal thymektomierte Mäuse gewinnen die Fähigkeit, Antikörper zu bilden, wieder zurück, we ihnen nach 3 bis 8 Wochen Thymocyten übertragen werden[12-14].

Die Bursa Fabricii ist neben dem Thymus das zweite primäre lymphatische Organ bei den Vögeln. Bei neonatal thymektomiert Küken geht die zelluläre Immunität verloren, während die Fähi keit zur Antikörperbildung erhalten bleibt. Bursektomierte Küken dagegen verlieren die humorale Immunität, haben aber di Fähigkeit Transplantate abzustoßen, d.h. die zelluläre Immuni tät ist intakt. Bei den Vögeln läßt sich für die beiden funktionellen Grundtypen der Immunität eine klare anatomische Zuordnung treffen. Das Bursa-Äquivalent ist beim Säugetier noch nicht gefunden, jedoch scheint das Knochenmark diese Funktion zu erfüllen.

Bei Mäusen, welche die Fähigkeit der humoralen Immunität durc Röntgenstrahlen verloren haben, kann die Unfähigkeit der Anti körperbildung wieder aufgehoben werden, wenn ihnen Thymus- und Knochenmarkszellen injiziert werden. Bei Injektion von Thymus- und Knochenmarkszellen kann die Antikörperbildung nicht angeregt werden. Es besteht also eine Zellkooperation zwischen den Lymphocyten aus dem Thymus und denen aus dem Knochenmark. Diese Kooperation ist von entscheidender Bedeutung für ein intaktes Immunsystem[15-36].

II. 2. Das Immunsystem

Bei höheren Organismen, welche die Fähigkeit besitzen, zwisch körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden, setzt sich die Abwehr gegen Fremdkörper aus einer Vielzahl

von aufeinander abgestimmten, sich ergänzenden Wirkungsmechanismen zusammen[37-39]. Den Zusammenhang verdeutlicht Abbildung 1.

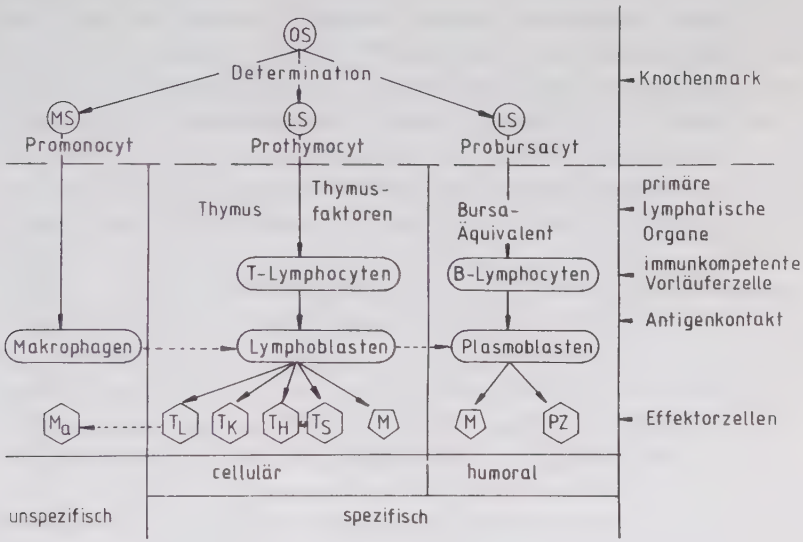


Abb. 1: Das Immunabwehrsystem (OS = omnipotente Stammzelle, MS = myeloide Stammzelle, LS = lymphatische Stammzelle, M_a = aktivierte Makrophagen, TL = Lymphokine, T_K = T-Killerzelle, T_H = T-Helferzelle, T_S = T-Suppressorzelle, M = Memoryzelle, PZ = Plasmazelle)

Das unspezifische Abwehrsystem - alleinige Abwehr bei den Wirbellosen - ist als Sofortabwehr gegenüber einem weiten Spektrum von Mikroorganismen wirksam. Sowohl die Mikrophagen (eosinophile und neutrophile Granulocyten) als auch die Makrophagen phagocytieren Fremdkörper. Die Makrophagen sind dabei äußerst aktiv bei der Aufnahme und beim Abbau von Antigenen. Die Wechselwirkungen mit dem spezifischen Abwehrsystem beziehen sich auf die Präsentation des Antigens für immunkompetente T-Lymphocyten, den Transport von Antigenen in die sekundären lymphatischen Organe und die Vermittlung bei der B-T-Lymphocyten-Kooperation zur Antikörpersynthese. Unter dem Einfluß

von Lymphokinen werden die Makrophagen aktiviert und gezielt in das spezifische Abwehrgeschehen einbezogen[40-53].

Mikroorganismen, die die unspezifische Immunität zu durchbrechen oder zu umgehen vermögen, stoßen auf ein weiteres Abwehrsystem: das spezifische Immunabwehrsystem. Dieses ermöglicht auf humoraler und auf zellulärer Ebene die Erkennung eines Antigens und bewirkt die Auslösung einer gegen dieses gerichteten spezifischen Abwehrreaktion[54-57]. Der gesunde Organismus besitzt eine Immuntoleranz, d.h. er bildet keine Antikörper gegen die eigenen, nicht entarteten Proteine[58-61].

Im Knochenmark befinden sich die omnipotenten Stammzellen, welche sich zu lymphatischen Stammzellen differenzieren können. Diese wandern in die primären lymphatischen Organe ein und proliferieren und differenzieren zu immunkompetenten, antigensensiblen Lymphocyten. Diese Lymphocyten lassen sich in zwei Klassen einteilen: Zum einen in die unter dem Einfluß des Thymus differenzierten T-Lymphocyten, zum anderen in die unter dem Einfluß des Bursa-Äquivalents differenzierten B-Lymphocyten. Für die Reifung der T-Lymphocyten kommt den Thymusfaktoren eine bedeutende Rolle zu, während diesbezüglich bei den B-Lymphocyten noch keine klaren Vorstellungen bestehen. B- und T-Lymphocyten lassen sich durch charakteristische Antigenreceptoren auf ihrer Oberfläche identifizieren. Die B-Lymphocyten besitzen im Gegensatz zu den T-Lymphocyten oberflächenstabile Immunoglobuline an den Zellmembranen[33, 62-66].

Nach Kontakt mit einem Antigen beginnt sich die antigengeprägte Zelle zu teilen. Am Ende der Zellteilungsserie entstehen aus den für ein Antigen spezifischen T- oder B-Lymphocyten die lymphatisch sensibilisierten Effektorzellen und die antikörperproduzierenden Plasmazellen. Die T-Lymphocyten sind für die zelluläre und die B-Lymphocyten für die humorale Immunität verantwortlich. Ein Teil der Blasten revertiert zu kleinen Lymphocyten, den langlebigen Memoryzellen, welche bei erneutem Antigenkontakt die entsprechende Immunantwort liefern

Für die Induktion der Antikörperbildung ist eine Kooperation immunkompetenter Zellen notwendig. Die B-Lymphocyten werden durch die antigenerkennende T-Helferzelle, welche das Antigen präsentiert, zur Antikörperbildung veranlaßt[28, 49, 50, 67-78]. Damit die Antikörperproduktion nicht hemmungslos abläuft, dafür sorgt der Gegenpart der T-Helferzelle: die T-Suppressorzelle. Sie besitzt die Fähigkeit, humorale und zelluläre Immunreaktionen abzuschwächen oder zu unterdrücken[77, 79-91]. Diese beiden Zelltypen stellen also einen wichtigen Regulationsmechanismus dar. Eine weitere Effektorzelle ist die enddifferenzierte T-Killerzelle. Sie besitzt eine antigenspezifische cytotoxische Aktivität, d.h. sie kann andere Zellen, die auf ihren Oberflächen die spezifischen Antigene tragen, beim direkten Kontakt abtöten. Die anderen zur Immunreaktion beitragenden Zelltypen können zahlreiche lösliche Mediatorstoffe produzieren und damit den Verlauf der Immunantwort nachhaltig beeinflussen. Stimulierte T-Lymphocyten sezernieren Lymphokine, welche keine Immunoglobulinstruktur aufweisen. Bis heute kennt man folgende Lymphokine:

1) den die Makrophagenauswanderung hemmenden Faktor (migration inhibition factor, MIF), welcher die Wanderungsaktivität von Makrophagen so einschränkt, daß es zu einer Akkumulation von Makrophagen am Ort der Immunreaktion kommt.
2) den Makrophagen bewaffnenden Faktor (specific macrophage arming factor, SMAF oder macrophage cytotoxic factor, MCF). Dieser bindet sich an die Makrophagen und verleiht diesen die Fähigkeit, Zielzellen spezifisch zu erkennen, zu binden und zu zerstören.
3) den Makrophagen aktivierenden Faktor (macrophage activating factor, MAF). Dieser äußert sich in einer gesteigerten Aktivität, Fremdzellen zu phagocytieren.

Hiermit wird ersichtlich, daß das T-Zellsystem eine übergeordnete, die Immunreaktivität auf sämtlichen Ebenen beeinflussende, regulierende Funktion besitzt[92-100].

II. 3. Immundefekte

Hier unterscheidet man zum einen zwischen dem spontan vorkommenden und oft vererbten Primären Immundefekt (PID) und zum anderen dem Sekundären Immundefekt (SID), welcher häufig als Begleiterscheinung oder als Folge von zahlreichen Krankheiten auftritt[101-105]. Der PID kann in den humoralen Defekt (B-Zellsystem gestört), den zellulären Defekt (T-Zellsystem nicht intakt) und den kombinierten Defekt (Stammzellsystem nicht funktionsfähig) eingeteilt werden. Tabelle 1 führt einige Beispiele auf (nicht vollständig).

Tabelle 1: Beispiele von Primären Immundefekten

Krankheit	Defekt	Immunantwort hum.	Immunantwort cell.	Folgen	Behandlung	Lit.
Agammaglobulinämie (Bruton)	B-Zelle produziert zu wenig IgA, IgM und IgG	negat.	normal	bakter. Infekt.	IgG-Gabe Thymusfaktoren	106
Thymusaplasie (DiGeorge)	T-Zelle	normal	negat.	virale Infekt.	Thymustranspl. Thymusfaktoren	107-110
Agammaglobulinämie (Schweizer Typ)	1. Stammzelle 2. Adenosindesaminase	negat.	negat.	Infekt.	Knochenmarkstransplant.	111
Wiskott Aldrich	Phagocytose verringert, keine B- und T-Zellprolifer.	negat.	negat.	Infekt.		111

Das Multiple Myelom (ungehemmte B-Zellproliferation)[112,113], das Waldenström-Syndrom (IgG-Überproduktion)[102] und das Hodgkin-Syndrom[114,115] werden den Sekundären Immundefekten zugeordnet.

Bei Autoimmunerkrankungen ist die Immuntoleranz gestört, d. h. es bilden sich Antikörper gegen die körpereigenen Proteine (Autoantikörper). Zu diesen Erkrankungen zählen Myasthenia gravis (organspezifisch; AAK gegen quergestreifte Muskulatur)[116], chronische Hepatitis (organspezifisch; AAK gegen glatte Muskulatur)[102], das Sjögren-Syndrom (organspezifisch; AAK gegen IgG, Mitochondrien)[118], die rheumatoide Arthritis (nicht organspezifisch; AAK gegen IgG)[102] und der Systemische Lupus Erythematodes (nicht organspezifisch; AAK gegen DNS und Nukleoproteine)[117].

II. 4. Thymuspeptide

Die bis heute bekannten Thymuspeptide werden zum Teil mit gutem Erfolg bei chronischen Infektionen[119-121, 133-137], Autoimmunerkrankungen[116-118, 123-126] und in der Krebstherapie[122, 127-132] angewandt.

Seit 1966 wurden folgende Thymuspeptide isoliert und strukturell aufgeklärt: Thymosin α1, Thymosin ß1, Thymosin ß4, Thymosin ß8, Thymosin ß9, Thymopoietin I, Thymopoietin II, Thymopoietin III, Facteur Thymique Serique, Humoraler Thymus Faktor, Serum Faktor, Thymostimulin, Thymon A, Thymon B und Thymon C.

II. 4. 1. Thymosin-Fraktion 5 (TF 5)

TF 5 ist eine Grobfraktion, bestehend aus über 25 Polypeptiden, und wird in 5 Extraktionsschritten aus Kalbsthymus gewonnen[3]. TF 5 ist aktiv im E-Rosetten-Test[139], im Graft versus Host (GvH)-Test[140], im "Mixed-Lymphocyte-Culture" (MLC)-Test[141] und im "Migration-Inhibiting-Factor" (MIF)-Test[142]. Weiterhin erhöht TF 5 die Immunabwehr in genetisch athymischen Mäusen[139, 143], vermehrt den intrazellulären cyclo-Adenosinmonophosphat (c-AMP)-Spiegel in Lymphocyten[144] und induziert in Knochenmarkszellen die terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT)[145].

II. 4. 2. Thymosin $\alpha 1$

Thymosin $\alpha 1$ wird aus TF 5 isoliert[138)] und ist strukturell (28 Aminosäuren, 3108 D, pI:4,2) aufgeklärt[146)]. Dieses am besten untersuchte Polypeptid wird klinisch eingesetzt[147,148] In den meisten Testsystemen ist Thymosin $\alpha 1$ ungefähr 10 bis 1000-fach aktiver als TF 5[146, 149, 150)]. Synthetisiert wurde Thymosin $\alpha 1$ nach Festphasen-, nach klassischen und nach gentechnischen Verfahren[151-160)].

II. 4. 3. Thymosin ß1

Das aus 74 Aminosäuren bestehende Thymosin ß1 (8451 D, pI:6,7) ist in seiner Sequenz aufgeklärt[162)] und kann ebenfalls aus TF 5 isoliert werden[161)]. In folgenden Testsystemen zeigt Thymosin ß1 keinerlei biologische Aktivität: MLC-, MIF-, TdT- und E-Rosetten-Test[150, 161)]. Über Synthesen wurd bislang noch nicht berichtet.

II. 4. 4. Thymosin ß4

Thymosin ß4 (43 Aminosäuren, 4982 D, pI:5,1) wurde zum erste Mal von Low et al[163)] isoliert und sequenziert. Ebenfalls au TF 5 konnte Hannappel et al[164)] Thymosin ß4 mit HPLC-Methode isolieren. Im MIF- und TdT-Test ist das Polypeptid aktiv[163)] Bislang wurde von zwei Arbeitsgruppen über Thymosin ß4-Synthesen berichtet[165-168)].

II. 4. 5. Thymosin ß8 und Thymosin ß9

Bei Thymosin ß8 (39 Aminosäuren, 4518 D) handelt es sich um ein Artefakt von Thymosin ß9, welches aus TF 5 isoliert wurde[227)]. Die Sequenz von Thymosin ß8 ist, bis auf das C-termi nale Dipeptid -Ala-Lys-OH, mit der Sequenz von Thymosin ß9 identisch.

Sequenz von Thymosin ß9 nach Hannappel et al[227]:

Ac-Ala-Asp-Lys-Pro-Asp-Leu-Gly-Glu-Ile-Asn-Ser-Phe-Asp-
-Lys-Ala-Lys-Leu-Lys-Lys-Thr-Glu-Thr-Gln-Glu-Lys-Asn-
-Thr-Leu-Pro-Thr-Lys-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-Gln-
-Ala-Lys-OH

Bis heute gibt es von biologischen Aktivitätsuntersuchungen sowie Synthesen noch keine Berichte.

II. 4. 6. Facteur Thymique Serique (FTS)

Zum ersten Mal wurde 1973 FTS isoliert[170, 171]. Obwohl FTS aus Seren der verschiedensten Säuger gewonnen werden kann, wird es routinemäßig aus Schweineserum isoliert[172, 173]. Es handelt sich um ein Nonapeptid (859 D, pI:7,5), welches in seiner Struktur aufgeklärt ist[174]. FTS kann außer im Serum auch im Thymus nachgewiesen werden[175, 176]; dort ist er in den epithelialen Zellen lokalisiert[177]. Im E-Rosetten-Test[178] und im Mitogen-Test[179, 180] ist FTS aktiv, reduziert jedoch die TdT[181, 210]. Sowohl auf T-Helferzellen als auch auf T-Suppressorzellen wirkt das Nonapeptid stimulierend[182, 183]. Aufgrund dieser Fakten wird FTS klinisch bei Patienten mit Systemischem Lupus Erythematodes[172] und bei hochgradig viralen Infektionen eingesetzt[134]. FTS und sehr viele Derivate wurden schon synthetisiert[184-189].

II. 4. 7. Humoraler Thymusfaktor (THF)

Erstmals wurde 1967 über THF berichtet[190]. Der Thymusfaktor kann aus Mäuse- und Kalbsthymus isoliert werden[191-193]. Der sich aus wahrscheinlich 31 Aminosäuren aufbauende Thymusfaktor (3220 D, pI:5,6) ist noch nicht sequenziert. THF ist im GVH-[194], im Mitogen-[195], im MLC-[196] und im E-Rosetten-Test[197] aktiv. Ebenso erhöht er den cAMP-Spiegel[198]. Im Klinikbereich wird der Thymusfaktor bei viralen Infektionen eingesetzt[199].

II. 4. 8. Thymostimulin (TS)

Hier handelt es sich um einen Kalbsthymusextrakt, der sich aus mehreren Polypeptiden mit einem Molekulargewicht zwische 1000 und 12000 zusammensetzt[111, 200, 201, 209]. Dieser Extrakt wird klinisch bei den verschiedensten Immunmangelerkra kungen eingesetzt[111, 137].

II. 4. 9. Serumfaktor (SF)

Astaldi et al[202] berichtete 1976 zum ersten Mal von einem menschlichen Serumfaktor, dessen Zusammensetzung bis heute ebenfalls unbekannt ist. Es wird angenommen, daß es sich um einen thymusabhängigen Faktor handelt, da der SF bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom oder anderen schweren Immunmangeler krankungen nicht nachzuweisen ist[203-205, 211].

II. 4. 10. Thymon A, Thymon B und Thymon C

Alle drei Thymone werden aus Rinderthymus gewonnen[206-208]. Thymon A baut sich wahrscheinlich aus 68 bis 71 Aminosäuren (7291-7677 D) auf und stimuliert die cAMP-Synthese[206]. Aus 13 verschiedenen Aminosäuren baut sich Thymon B auf und besitzt ein geringeres Molekulargewicht als Thymon A. Im Gegensatz zu Thymon A kann Thymon B die cAMP-Synthese nicht anregen, wohl aber die cGMP-Synthese[207]. Über Thymon C wird berichtet, daß es sowohl die cAMP- als auch die cGMP-Synthese stimulieren kann[208].

II. 4. 11. Thymopoietin I, Thymopoietin II und Thymopoietin (TPI, TPII und TPIII)

TPI und TPII werden aus Rinderthymus isoliert[212], TPIII aus der Milz[215]. Die ersten Sequenzvorschläge für TPI und TPII wurden 1981 korrigiert und gemeinsam mit der Sequenz für TP publiziert[215].

Sequenzen von TPI, TPII und TPIII:

TPI H_2N-Gly-Gln-

TPII H_2N-Pro-Glu-Phe-Leu-Glu-Asp-Pro-Ser-Val-Leu-

TPIII H_2N-Pro-Glu-

-Thr-Lys-Glu-Lys-Leu-Lys-Ser-Glu-Leu-Val-

-Ala-Asn-Asn-Val-Thr-Leu-Pro-Ala-Gly-Glu-

TPI -Asp-

TPII -Gln-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-Val-Glu-Leu-Tyr-

TPIII -Glu-

TPI -His-

TPII -Leu-Gln-Ser-Leu-Thr-Ala-Leu-Lys-Arg-COOH

TPIII -His-

Von diesen Thymusfaktoren ist TPII das am besten untersuchte. TPII stimuliert die T-Zell-Differenzierung, speziell die Differenzierung von Prothymocyten zu Thymocyten[213, 228]. Aufgrund vieler immunregulatorischer Effekte in verschiedenen Modellsystemen bei Tieren wird TPII bei der Autoimmunkrankheit Myasthenia gravis eingesetzt[217]. Auf der Suche nach dem aktiven Zentrum gelang es über das biologisch aktive Thymopoietin 29-41[217] zum biologisch ebenfalls aktiven Thymopoietin 32-36 (TP 5) zu kommen, welches nahezu sämtliche biologische Eigenschaften von TPII besitzt[218-223, 226]. Da für klinische Zwecke die Isolierung von TPII zu aufwendig wäre, Synthesen nicht effizient genug sind[224, 225], wird das TP 5 eingesetzt. Trotz der kurzen Halbwertszeit im Plasma[229] ist TP 5 hauptsächlich bei Autoimmunerkrankungen sowie Krebs wirksam[217].

III. THEMENSTELLUNG

Aufgrund der schwierigen und arbeitsintensiven Isolierung von Thymuspeptiden aus biologischem Material stehen diese nur in begrenztem Maße zur Verfügung. Um jedoch genaue Aussagen bezüglich der Funktionsweise dieser Peptide machen zu können, ist man daher fast immer auf synthetisch hergestellte Substanzen angewiesen.

Der wachsende Einsatz von Thymopoietin (32-36) bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Krebs erfordert relativ große Mengen an Thymopoietin (32-36). Es soll eine Möglichkeit erarbeitet werden, dieses Peptid einfach, schnell, einheitlich und in guten Ausbeuten darzustellen. Ebenso sollen die Peptide Thymopoietin (34-36) und Thymopoietin (33-36) synthetisiert werden, um zu testen, ob auch sie schon biologische Aktivität besitzen.

Neben diesen Synthesen soll erstmals ein Fragment von Thymosin ß9 dargestellt werden, da von Thymosin ß9 - außer der Isolierung sowie dem Vorschlag für die Primärstruktur - weder die biologische Aktivität noch Methoden für Total- und Fragmentsynthesen bekannt sind. Außerdem soll ein geschütztes Thymosin ß9 (18-29) synthetisiert werden, welches sowohl C- als auch N-terminal weitergekuppelt werden kann.

Sämtliche Peptide werden nach klassischen Methoden hergestellt, da die Synthese biologisch aktiver Peptide nach der Festphasenmethode häufig zu Rumpf- und Fehlsequenzen führt, welche sehr schwer vom Hauptprodukt abzutrennen sind. Auch die drastischen Abspaltungsbedingungen vom Harz führen nicht selten zu einer teilweisen Zerstörung des Moleküls.

Zwischenverbindungen werden durch Schmelzpunkte, Drehwerte, Elementaranalysen sowie durch ^{13}C-NMR- und FD-MS-Messungen charakterisiert.

Die freien Peptide werden bezüglich ihrer Reinheit mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie überprüft.

Der Einfluß der Peptide auf Tumorzellen wird getestet.

IV. SPEZIELLER TEIL

IV. 1. Überlegungen zur Syntheseplanung von Thymopoietin (32-36)

Das Pentapeptid H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH (Thymopoietin 32-36) ist für den Synthetiker insofern ein etwas problematisches Molekül, da vier der fünf Aminosäuren mehrfunktioneller Natur sind.

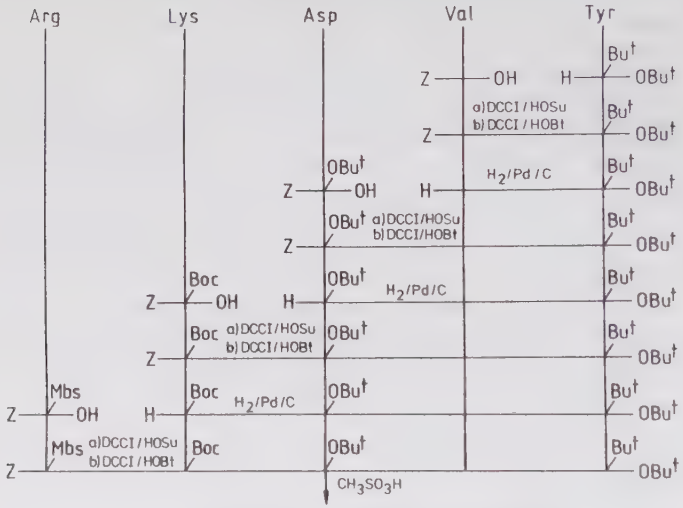
In dieser Arbeit soll die konventionelle Synthese angewendet werden. Hierfür stehen zum einen die Methode des Minimalschutzes nach Hirschmann und Veber[230], zum anderen die Methode des Maximalschutzes zur Verfügung. Auf die Taktik der geringstmöglichen Maskierung der Drittfunktionen wird verzichtet, da sie nicht die Sicherheit des nebenproduktfreien Aufbaus besitzt. Ein weiterer Nachteil ist die weitgehende Einschränkung der Verknüpfungstechnik auf die Azidmethode[231], einem Verfahren, das zu Nebenreaktionen als Folge einer Azid-Isocyanat-Umlagerung Anlaß gibt[232].

Unter Verwendung der Methode des Maximalschutzes stehen weitere effiziente und relativ racemisierungssichere Kondensationsmethoden wie die gemischte Anhydridmethode[233], das DCCI/HOBt-[234] und das DCCI/HOSu-Verfahren[235] zur Verfügung. In dieser Arbeit wird unter globaler Verwendung von Schutzgruppen das Pentapeptid schrittweise vom C-terminalen Ende, mit Reinigung und Charakterisierung der Zwischenstufen, synthetisiert.

Da in diesem Peptidverband keine schwefelhaltigen Aminosäuren vorkommen, wird als intermediärer Aminoschutz die Benzyloxycarbonyl(Z)-Gruppe[236] und als konstanter Schutz der Drittfunktionen die p-Methoxybenzosulfonyl(Mbs)-[237], tert.-butyloxycarbonyl (Boc)-[238] und die tert.-Butylgruppen (Bu^t) eingesetzt (Schwyzer-Taktik)[239]. Als weitere Taktik kommt die differenzierte Acidolyse, unter Verwendung der Adamantyl-1-methylethoxycarbonyl (Adpoc)-[240] bzw. der α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl(Ddz)-Gruppe[241] als Intermediärschutz und den voranstehenden Gruppen als konstanter Schutz, in Betracht.

IV. 2. Synthese von Thymopoietin(34-36), Thymopoietin(33-36) und Thymopoietin(32-36)

IV. 2. 1. Syntheseweg 1 und 2



Syntheseschema 1 und 2: Darstellung von Thymopoietin(32-36)

Die für die Synthesewege benötigten Verbindungen Z-Val-OH, Z-Asp(OBu^t)-OH, Z-Lys(Boc)-OH, Z-Arg(Mbs)-OH sowie die entsprechenden N-Hydroxysuccinimidester lassen sich problemlos synthetisieren. Die Darstellung von H-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl hingegen gestaltet sich äußerst aufwendig. Direkte Umsetzung von Tyrosin mit Isobutylen in Gegenwart von Schwefelsäure führte, im Gegensatz zu Schröder[242], nicht zum Ziel. Ausgehend von Z-Tyr-OH gelingt die Darstellung des Z-Tyr(Bu^t)-OBu^t durch säurekatalysierte Reaktion mit Isobutylen; als Beiprodukt findet man jedoch stets Z-Tyr-OBu^t [243, 244]. Die Trennung der beiden Derivate erfolgt durch ihr unterschiedliches Lösungsverhalten in warmem Hexan.

Versuche, Z-Tyr(Bu^t)-OH vollständig zu verestern, zeigten, daß unter den üblichen Bedingungen die Etherbindung sich zum Teil wieder öffnet. Anschließende Hydrierung des öligen, dünnschichtchromatographisch einheitlichen Z-Tyr(Bu^t)-OBu^t liefert in 61%-iger Ausbeute das gut kristallisierende H-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl.

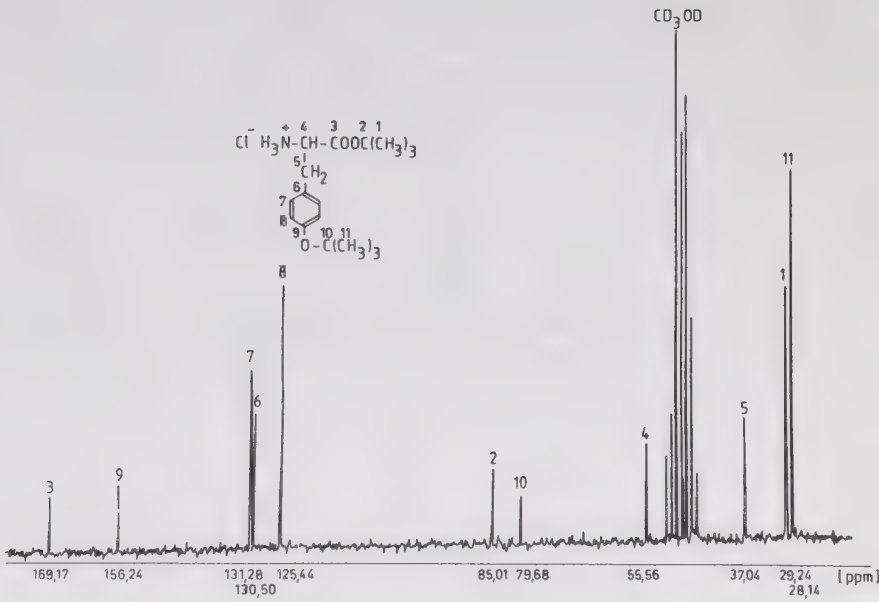


Abb. 2: ^{13}C-NMR-Spektrum von H-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, protonenbreitbandentkoppelt, 22.628 MHz, 210 mg in 1 ml CD_3OD.

Das Dipeptid Z-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t läßt sich sowohl durch Umsetzung von Z-Val-OH als auch von Z-Val-OSu mit H-Tyr(Bu^t)-OBu^t in guten Ausbeuten darstellen. Nach Entfernung der Aminoschutzgruppe des Dipeptids, welche schnell und in Ausbeuten über 90% verläuft, wird nach beiden Kupplungsmethoden problemlos zum gut kristallisierenden Tripeptid Z-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t verlängert.

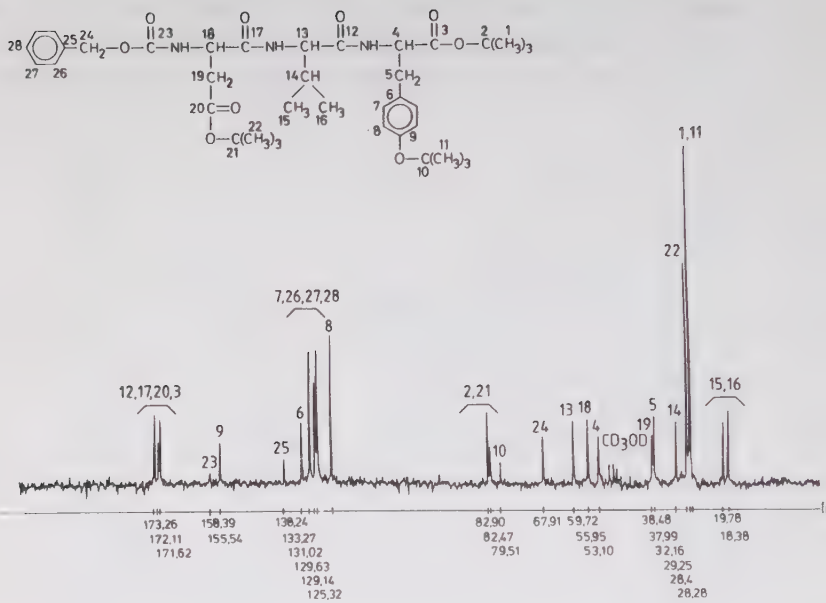


Abb. 3: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 300 mg in 2 ml CD_3OD.

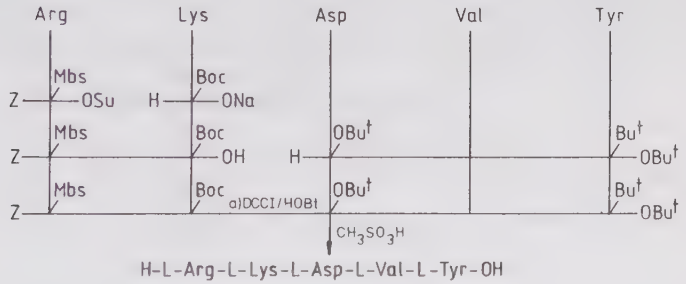
Die Synthese des Tetrapeptids Z-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-(Bu^t)-OBu^t gelingt durch Umsetzung von Z-Lys(Boc)-OH bzw. Z-Lys(Boc)-OSu mit dem von der Z-Gruppe befreiten Tripeptidester Entacylierung der Aminogruppe des Tetrapeptids und anschließende Verknüpfung mit Z-Arg(Mbs)-OH respektive Z-Arg(Mbs)-OSu liefert ein gut kristallisierendes Pentapeptid in 63- bzw. 91%iger Ausbeute.

Ergebnis des Racemattests: Die Prüfung auf Racematanteile nach Zitat 245 ergibt folgende Werte:

Kupplungs-methode	% D-Arg	% D-Lys	% D-Asp	% D-Val	% D-Tyr
DCCI/HOBt	2.1	3.8	7.4	0.8	2.1
DCCI/HOSu	42.7	2.3	6.9	1.5	3.1

Die Racemisierung des Arginins erfolgt während der Kondensation, da die Ausgangsverbindung Z-Arg(Mbs)-OSu nur 0.9% D-Arg enthält. Ein Wiederholungsversuch der Kupplung ergab, trotz sehr sorgfältig gewählter Bedingungen, immer noch 24.7% Anteile an D-Arg. Die Gründe für eine derart hohe Racemisierungsrate sind unbekannt.

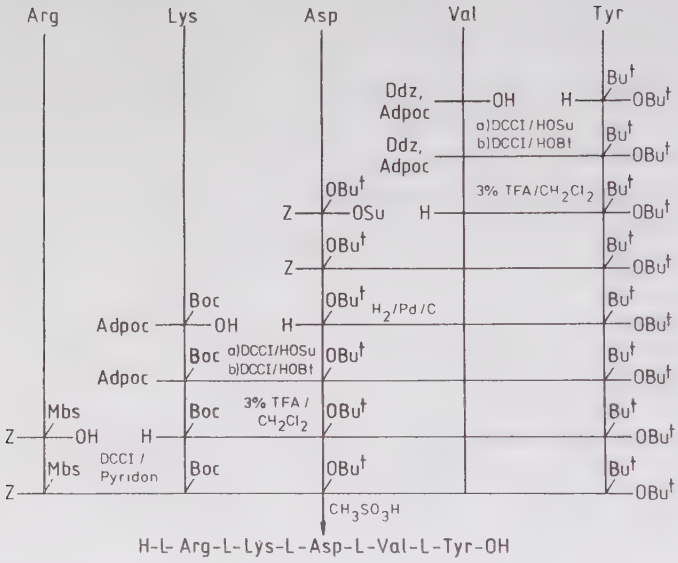
IV. 2. 2. Syntheseweg 3



Syntheseschema 3: Darstellung von Thymopoietin (32-36)

Bei diesem eingeschlagenen Weg wird Z-Arg(Mbs)-OSu direkt mit dem Natriumsalz des N^{ϵ}-Boc-Lysins zum C-terminal freien Dipeptid Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-OH umgesetzt. Dies ergibt ein gut kristallisierendes, dünnschichtchromatographisch einheitliches, kondensationsfähiges Produkt. Die weitere Umsetzung mit dem Tripeptid-tert.-butylester H-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t nach der DCCI/HOBt-Methode liefert in unbefriedigender Ausbeute (32%) das geschützte Pentapeptid.

IV. 2. 3. Syntheseweg 4



Syntheseschema 4: Darstellung von Thymopoietin (32-36)

Bei diesem Syntheseweg wird zunächst Adpoc-Val-OH mittels DCCI/HOBt oder Adpoc-Val-OSu mit H-Tyr(Bu^t)-OBu^t zu dem leicht zu reinigenden und gut kristallisierenden Dipeptid Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t umgesetzt.

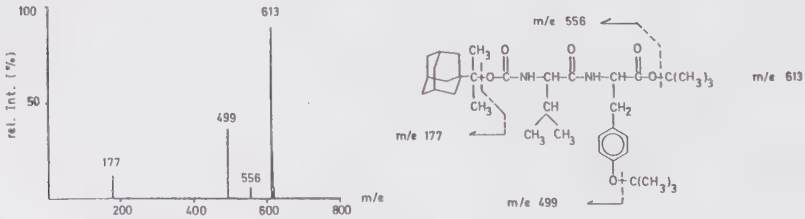


Abb. 4: Felddesorptionsmassenspektrum von Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t; Emitterheizstrom 15 mA.

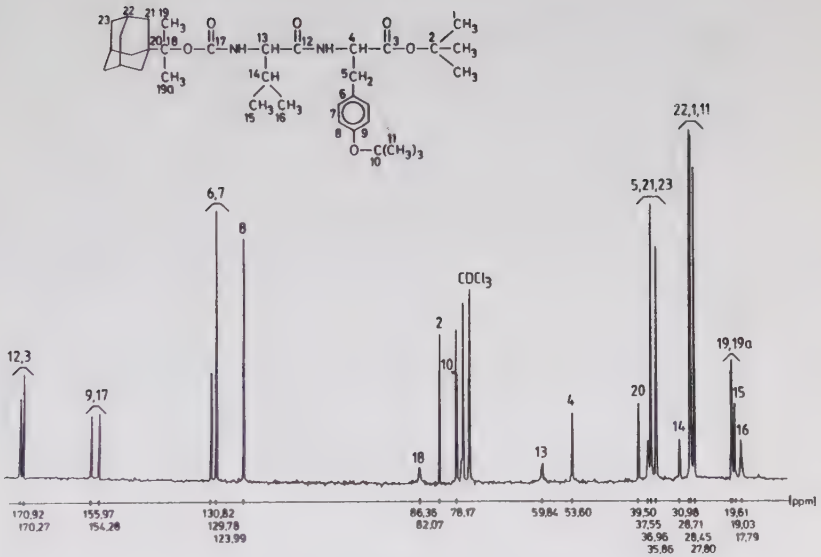


Abb. 5: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 250 mg in 1 ml $CDCl_3$.

Das ebenfalls eine säurelabile Aminoschutzgruppe enthaltende Dipeptid Ddz-Val-Tyt(Bu^t)-OBu^t kann nach denselben Methoden, nur mit den anderen Ausgangsverbindungen Ddz-Val-OH respektive Ddz-Val-OSu, synthetisiert werden. Tabelle 2 gibt eine Übersicht der physikalischen Daten der beiden geschützten Dipeptide.

Tabelle 2: Physikalische Daten der Dipeptide Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t und Ddz-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t.

Verbindung; Kupplungs-variante	Ausbeute (% d. Th.)	Fp (°C)	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N	% D-Val % D-Tyr
Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t						
via DCCI/HOBt	77	106	70.55 70.16	9.21 9.20	4.57 4.86	0.2 0.9
via DCCI/HOSu	75	104-106	70.55 70.00	9.21 9.39	4.57 4.72	0.4 0.4
Ddz-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t						
via DCCI/HOBt	73	96	66.43 66.59	8.20 7.97	4.56 4.89	0.4 0.9
via DCCI/HOSu	85	Oel	66.43 66.31	8.20 8.03	4.56 4.73	0.1 0.6

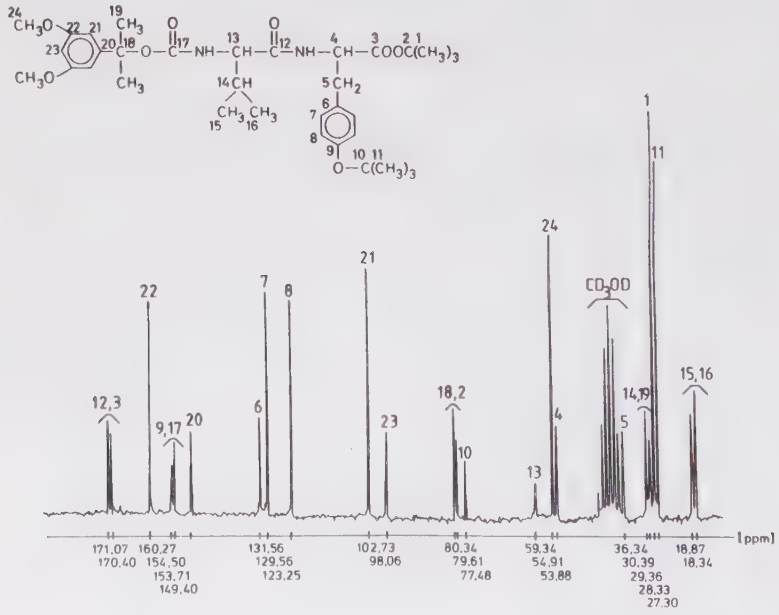


Abb. 6: ^{13}C-NMR-Spektrum von Ddz-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t, protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 300 mg in 1 ml CD_3OD.

Obwohl beide Dipeptide sich in befriedigenden Ausbeuten darstellen lassen, ist jedoch die Synthese von Adpoc-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t gegenüber der Synthese von Ddz-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t vorzuziehen, da die Adpoc-Aminosäuren bezüglich ihrer Stabilität und problemlosen Handhabung gegenüber den Ddz-Aminosäuren (Lagerung und Reaktion der Ddz-Aminosäuren müssen unter Lichtausschluß ausgeführt werden [241]) überlegen sind. Gegen Lichteinwirkung sind die Adpoc-Aminosäuren vollkommen stabil[246].

Die Abspaltung der Ddz- und der Adpoc-Gruppe aus den entsprechenden Dipeptiden erfolgt mit 3% TFA in CH_2Cl_2 innerhalb einer halben bis einer Stunde und führt zu dünnschichtchromatographisch einheitlichen und gut kristallisierenden Verbindungen. Da beim Einengen von Trifluoressigsäurelösung in Methylenchlorid eine Aufkonzentrierung der Trifluoressigsäure stattfindet, können während des Eindampfens die Abspaltungen in unkontrollierter Weise zu unerwünschten Nebenreaktionen führen. Fügt man der Reaktionslösung nach Beendigung der Reaktion 2 Volumenäquivalente Benzol zu, so wird zunächst das TFA/CH_2Cl_2-Gemisch entfernt; zusätzlich wird die Reaktionslösung so weit verdünnt, daß eine Weiterreaktion kaum noch stattfindet.

Mit einem Essigsäure-Ameisensäure 83% (g/g)-Wasser 7:1:2 (v/v)-Gemisch läßt sich die Adpoc-Gruppe ebenfalls abspalten, jedoch ist zum einen die Reaktionszeit erheblich länger (4 h), zum anderen kristallisiert die entsprechende Verbindung nicht so gut wie das H-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA.

Auf die Darstellung von Adpoc-Asp(OBu^t)-OH wird verzichtet, da zusätzlich zwei Schritte, ausgehend von Z-Asp(OBu^t)-OH, notwendig wären. Weiterhin ist das Tripeptid H-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t - wie schon die Synthesewege 1 und 2 zeigten - einfach zu synthetisieren.

Die Umsetzung von Adpoc-Lys(Boc)-OH und H-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t führt zum Tetrapeptid Adpoc-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-(Bu^t)-OBu^t und gelingt sowohl nach der DCCI/HOBt- als auch nach der DCCI/HOSu-Methode in zufriedenstellenden Ausbeuten.

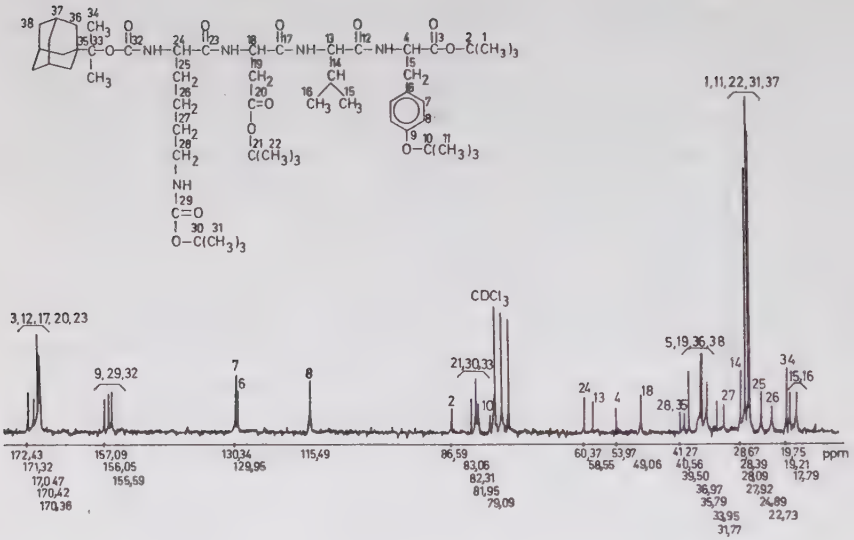
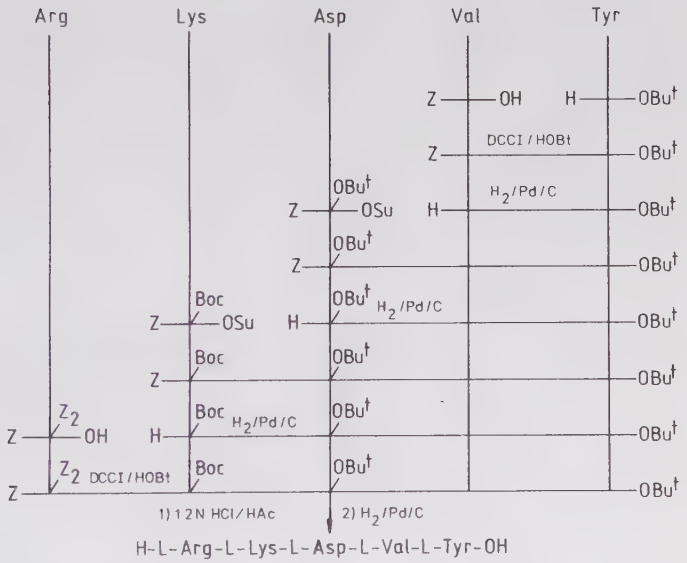


Abb. 7: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 250 mg in 1.5 ml $CDCl_3$.

Die selektive Abspaltung der Adpoc-Gruppe des Tetrapeptids Adpoc-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t gelingt mit 3% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (0 °C, 1 h). Die Abspaltungsselektivität in Gegenwart von Boc-Gruppen ist ein diffiziles Problem. Sie hängt unter anderem von dem Peptidverband ab. Horn et al[258] beobachteten bei größeren Peptiden, welche mit Adpoc- und Boc-Gruppen geschützt waren, daß bei Anwendung von 3% Trifluoressigsäure in Methylenchlorid als Abspaltungsreagens neben der Adpoc-Gruppe auch die Boc-Gruppe teilweise deblockiert wird. Weitere Untersuchungen[259] zeigen, daß z.B. bei der Behandlung von Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH sowie Adpoc-Ala-Lys(Boc)-Leu-OMe mit 0.1N Trifluorethanol in Chloroform die Adpoc-Gruppe des Tripeptids selektiv neben der Boc-Gruppe abgespalten werden kann, während bei Adpoc-Trp-Lys(Boc)-OH die selektive Abspaltung nicht gelingt.

Die Verlängerung des Tetrapeptids H-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t zum Pentapeptid Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t gelingt mit Z-Arg(Mbs)-OH unter Verwendung von DCCI und Pyridon.

IV. 2. 4. Syntheseweg 5



Syntheseschema 5: Darstellung von Thymopoietin (32-36)

Wie aus obigem Syntheseschema zu ersehen ist, wird bei diesem eingeschlagenen Weg die Phenolfunktion des Tyrosins nicht geschützt. Dies hat den Vorteil, daß auf die zeitraubende Synthese von H-Tyr(Bu^t)-OBu^t verzichtet werden kann. Die Strategie lehnt sich eng an den erfolgreichen Syntheseweg 1 an. Das Dipeptid Z-Val-Tyr-OBu^t kann ohne Probleme nach der DCCI/HOBt-Methode in guten Ausbeuten dargestellt werden. Nach hydrogenolytischer Entfernung der Z-Gruppe kann die Aminkomponente in bewährter Weise mit Z-Asp(OBu^t)-OSu zum geschützten Tripeptid

Z-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t verlängert werden, welches danach entacyliert und nachfolgend mit Z-Lys(Boc)-OSu zum Tetrapeptid Z-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t umgesetzt wird.

Als Alternative zum Z-Arg(Z_2)-OH sollte ursprünglich Adpoc-Arg(Adpoc$_2$)-OH in den Peptidverband inkorporiert werden, damit am Ende der Synthese das geschützte Pentapeptid in einem Schritt mit konzentrierter Trifluoressigsäure von sämtlichen Schutzgruppen befreit werden könnte. Es ist jedoch nicht möglich gewesen, Adpoc-Arg(Adpoc$_2$)-OH darzustellen. Alle Versuche Adpoc-Arg(Adpoc$_2$)-OH - anlehnend an die erfolgreiche Darstellung von Adoc-Arg(Adoc$_2$)-OH[260] - herzustellen, schlugen, trotz vielfältiger Variationen der Reaktionsbedingungen, fehl.

Die Synthese von Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t gelingt unter Verwendung von DCCI/HOBt durch Umsetzung von Z-Arg(Z_2)-OH mit H-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t.

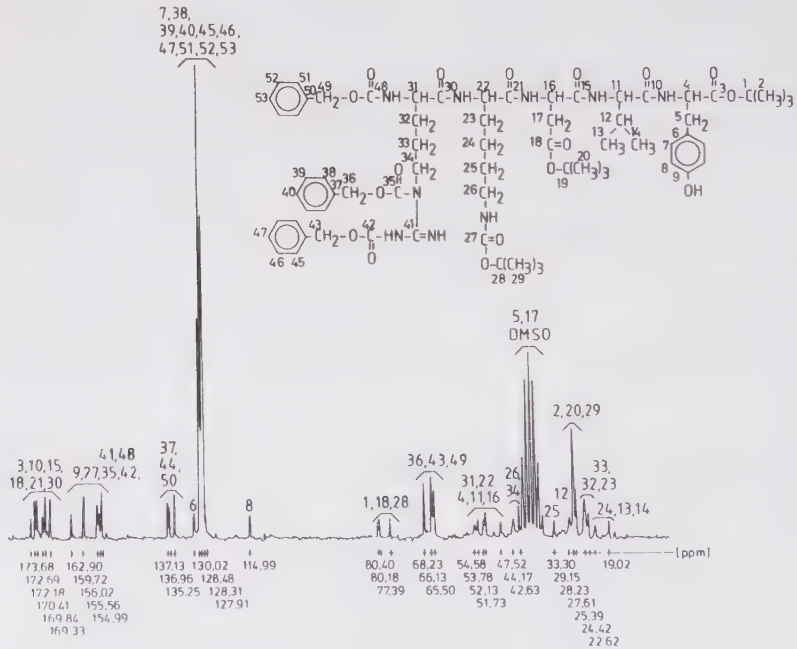


Abb. 8: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 200 mg in 1 ml DMSO.

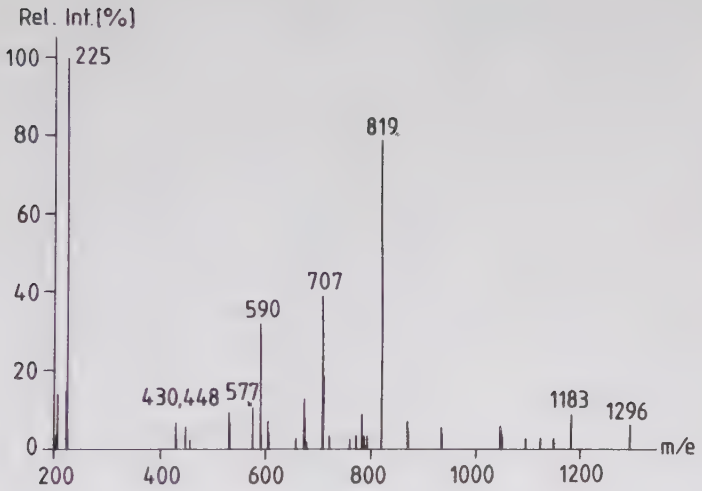


Abb. 9: Felddesorptionsmassenspektrum von Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t, Emitterheizstrom 15 mA.

Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen

m/e	Fragmentionen
1296	M^+
1283	Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp-Val-Tyr-C≡O$|^+$
819	Genese unbekannt
707	MH^+ - 590
590	O≡C-NH-Arg(Z)-Lys(Boc)-C≡O$|^+$
577	Genese unbekannt
448	H_2N-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-C≡O$|^+$ und/oder H_2N-Asp-Val-Tyr-$OBu^t|^+$ C≡O
430	448 - 18
225	Genese unbekannt

Tabelle 3: Physikalische Daten der Peptidderivate

Verbindung	Ausbeute (% d. Th.)	Fp (°C)	α_D^{20-24}	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N
Z-Val-Tyr-OBu^t	90	56-58	-20.5° (c=2, MeOH)	66.36 66.35	7.28 7.39	5.95 6.42
H-Val-Tyr-OBu^t·HCl	95	167-170	+4.9° (c=1.5, MeOH)	57.98 57.28	7.84 7.85	7.51 7.45
Z-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	78	137	-25.5° (c=2, MeOH)	63.63 63.19	7.38 7.38	6.55 6.40
Z-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	77	139-140	-16.8° (c=0.5, DMF)	62.12 62.32	7.76 7.63	8.05 8.05
Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t	82	100-102	-4.3° (c=1, DMF)	62.12 62.51	7.16 7.14	9.73 9.74

IV. 2. 5. Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung der Thymopoietinfragmente

Thymopoietin (34-36) sowie Thymopoietin (33-36) lassen sich aus H-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t bzw. H-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t durch Behandeln mit konzentrierter Trifluoressigsäure gewinnen. Sämtliche Schutzgruppen werden problemlos innerhalb kürzester Zeit abgespalten. Die beiden freien Peptide sind in 3 verschiedenen Laufmittelsystemen (A, J und K) einheitlich und zeigen gute Aminosäure- sowie Elementaranalysen. Der Anteil an D-Aminosäuren beträgt bei Thymopoietin (34-36) 4.1% D-Asp, 0.6% D-Val und 1.8% D-Tyr, bei Thymopoietin (33-36) 1.1% D-Lys, 6.1% D-Asp, 0.9% D-Val und 2.0% D-Tyr.

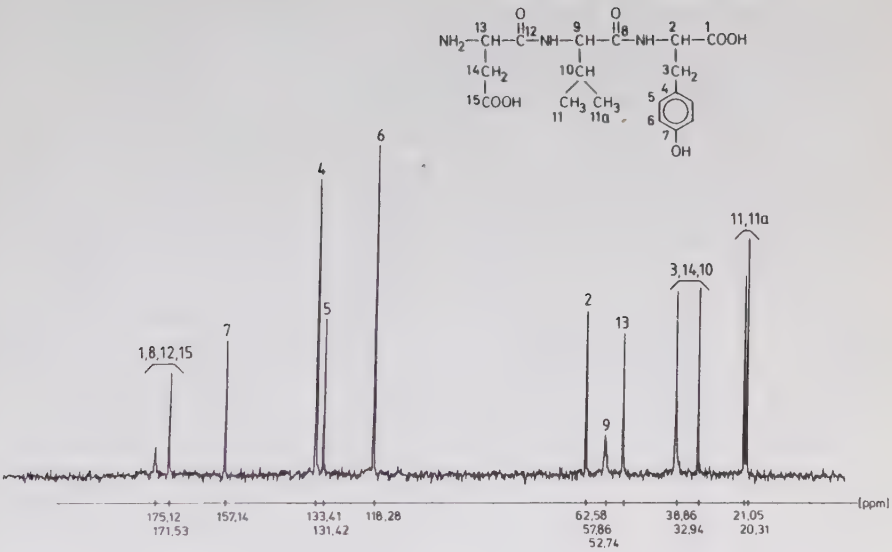


Abb. 10: ^{13}C-NMR-Spektrum von Thymopoietin (34-36), protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 300 mg in 1 ml D_2O.

Mit Methansulfonsäure kann das Pentapeptid Z-Arg(Mbs)-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t in einem Schritt von sämtlichen Schutzgruppen befreit werden. Das so erhaltene rohe Thymopoietin (32-36) wird mittels Ionenaustauscher (Amberlite IRA 400, Acetatform) in das Acetat übergeführt und danach an Sephadex LH 20 (Eluens Wasser/Methanol 9:1) chromatographiert. Anschließende Lyophilisation liefert das Pentapeptid, welches in den Laufmittelsystemen A, J und K einheitlich ist sowie eine gute Aminosäure- und Elementaranalyse zeigt. Der prozentuale Anteil an D-Aminosäuren beträgt: 2.1% D-Arg, 1.5% D-Lys, 6.0% D-Asp, 0.8% D-Val und 3.1% D-Tyr.

Die Abspaltung der Schutzgruppen von Z-Arg(Z_2)-Lys(Boc)-Asp-(OBu^t)-Val-Tyr-OBu^t gelingt in zwei Schritten. Zunächst werden die säurelabilen Gruppen mit 1.2N HCl in Eisessig entfernt, danach werden die Z-Gruppen hydrogenolytisch deblockiert. Die

Reinigung des Rohprodukts wird an Sephadex G-25 (Superfine) vorgenommen. Nach Lyophilisieren erhält man Thymopoietin (32-36) in reiner Form (physikalische Daten befinden sich in der Arbeitsvorschrift V. 10. 3. 2.).

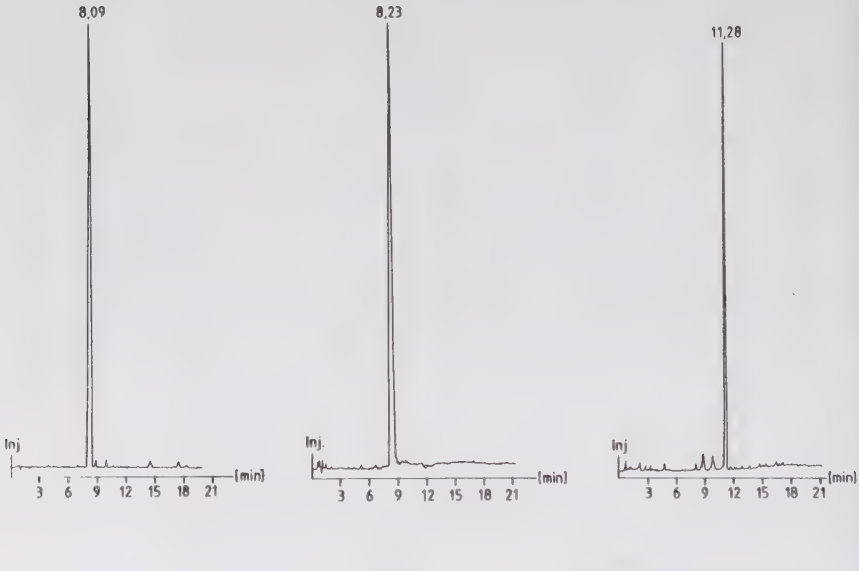


Abb. 11: HPLC-Chromatogramme von Thymopoietin (34-36) (A), Thymopoietin (33-36) (B) und Thymopoietin (32-36) (C). Säule: 4 x 125 mm Nucleosil 5-C-18; Eluent A: 20 mMol Natriumperchlorat (pH 2.1), Eluent B: Acetonitril; Gradient von 0 bis 25% B in 15 Minuten; Durchflußrate 2 ml/Min; Detektion bei 220 nm.

IV. 3. Überlegungen zur Synthese von Thymosin ß9 (18-29)

Thymosin ß9 (18-29) ist ein lineares Dodecapeptid mit folgender Primärstruktur: H-Lys-Lys-Thr-Glu-Thr-Gln-Glu-Lys-Asn-Thr-Leu-Pro-OH[227]. Mehr als die Hälfte der enthaltenen Aminosäuren sind trifunktioneller Natur. Da dieses Peptid weder schwefelhaltige Aminosäuren noch Tryptophan, Histidin, Arginin und Tyrosin enthält, können die in Abschnitt IV. 1. angeführten Überlegungen übernommen werden. Zusätzlich werden folgende Anforderungen an die Synthese gestellt:

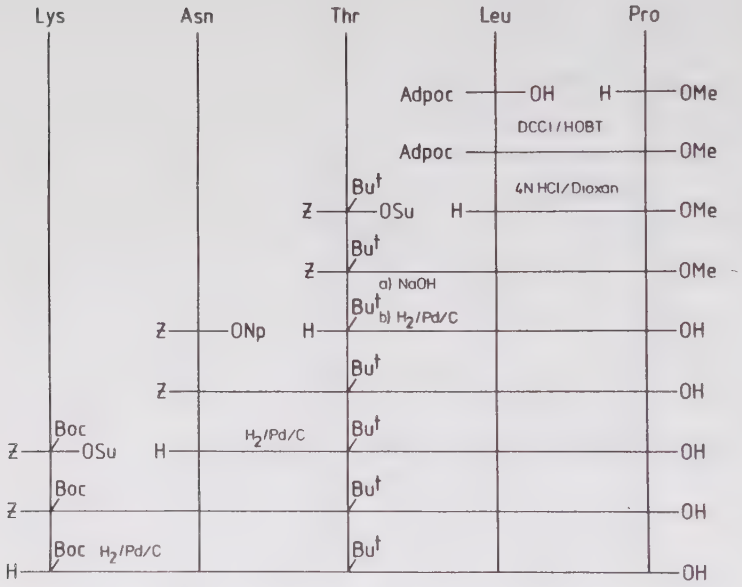
- Die biologische Aktivität einer wirksamen Verbindung ist von der optischen Reinheit abhängig. Daher sollen nur racemisierungsarme Methoden angewendet werden. Untersuchungen haben gezeigt, daß die verwendeten Kupplungsmethoden DCCI/HOBt[234, 247-249], DCCI/HOSu[250, 251], p-Nitrophenylester/HOBt[252, 253] und die Azidkupplung nach Honzl-Rudinger[254, 255] diese Bedingungen erfüllen.
- Esterverseifungen mit Alkali verlaufen oft unter Racemisierung und Bildung von Nebenprodukten[256]. Diese Schritte sollen möglichst umgangen werden.
- Um die Synthese ökonomisch zu gestalten, sollen alle mehrfach im Molekül vorkommenden Aminosäuren in der Synthese durch gleiche Derivatisierungsformen eingesetzt werden.
- Um auf drastische Abspaltungsmethoden zu verzichten, sollen nur Schutzgruppen Anwendung finden, die eine schonende Abspaltung erlauben.

  Verwendung finden daher die Z- und Boc-Gruppe als Aminoschutz und die tert.-Butylgruppen als Hydroxylschutz für Threonin. Glutamin und Asparagin werden ungeschützt eingesetzt, Glutaminsäure dagegen als tert.-Butylester. Von diesen Gruppen kann das Peptid am Ende mit Trifluoressigsäure befreit werden.

Aus diesen Überlegungen heraus bietet sich folgendes Synthesekonzept an, wonach Thymosin ß9 (18-29) durch Fragmentkondensation der Fragmente 4 + (3 + 5) aufgebaut werden kann.

IV. 3. 1. Synthese von Thymosin ß9 (18-29)

IV. 3. 1. 1. Darstellung von H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH (Fragment 25-29)



Syntheseschema 6: Darstellung von H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH

Mit dem DCCI/HOBt-Verfahren kann durch Umsetzung von Adpoc-Leu-OH und H-Pro-OMe das dünnschichtchromatographisch einheitliche und gut kristallisierende Dipeptid Adpoc-Leu-Pro-OMe synthetisiert werden.

Die Abspaltung der Adpoc-Gruppe gelingt bei Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten mittels 4N HCl in Dioxan. Die anschließende Aktivesterkupplung mit Z-Thr(Bu^t)-OSu führt zu dem öligen, aber dünnschichtchromatographisch einheitlichen Tripeptid Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe. Die anschließende Verseifung mit 1N NaOH liefert das gut kristallisierende, C-terminal ungeschützte, Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH.

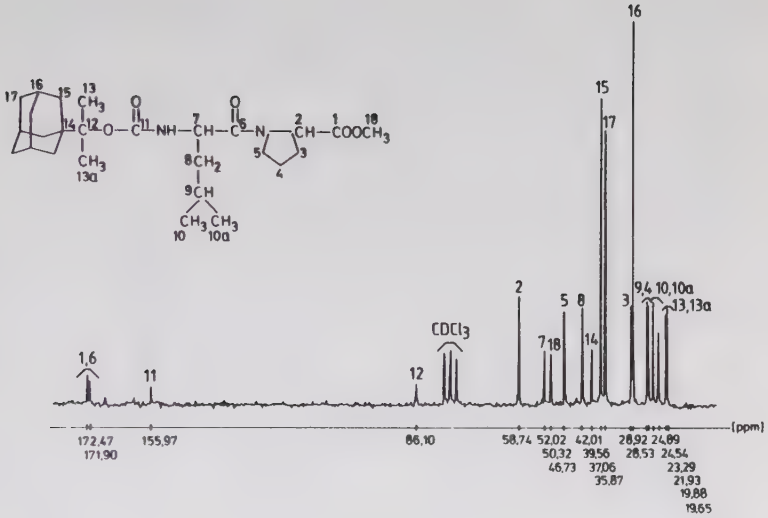


Abb. 12: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Leu-Pro-OMe, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 300 mg in 1.5 ml $CDCl_3$.

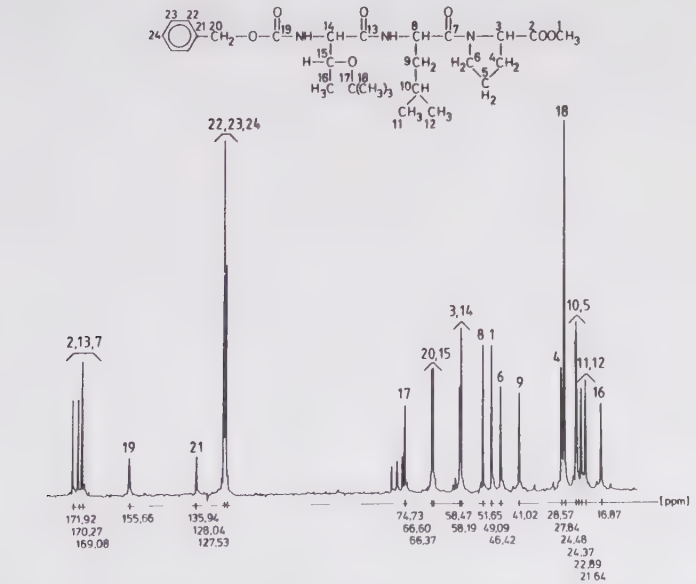


Abb. 13: ^{13}C-NMR-Spektrum Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 250 mg in 1 ml $CDCl_3$.

Bei Asparagin, welches als nächste Aminosäure eingebaut wird, muß bedacht werden, daß sie unter den Aktivierungsbedingungen mit DCCI zu Dehydratisierung unter Bildung von ß-Cyanoalanin neigt. Die erste Möglichkeit, die Darstellung von reinem Z-Asn-OSu, gelang nicht befriedigend. Dagegen konnte Z-Asn-ONp problemlos synthetisiert werden. Im IR-Spektrum kann keine nitrilhaltige Komponente nachgewiesen werden. Ist Asparagin bereits in das Peptidgerüst inkorporiert, ist auch dann keine Cyanoalaninbildung zu beobachten, wenn der DCCI/HOBt-Kupplungsansatz für längere Zeit bei Raumtemperatur ausgesetzt ist[246].

Die Umsetzung von Z-Asn-ONp mit H-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH liefert bei der Peptidverknüpfung Nitrophenol. Seine Entfernung ist deswegen erforderlich, weil sich eine katalytisch-hydrogenolytische Entacylierung anschließt. Nicht entferntes Nitrophenol führt reduktiv zum 4-Aminophenol, welches den Katalysator vergiftet oder zu schwer entfernbaren, farbigen Reaktionsprodukten führt[257]. Das synthetisierte Tetrapeptid Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH wird durch Umfällen aus DMF/Wasser vom entstandenen Nitrophenol befreit.

Die sich anschließende Abspaltung der Z-Gruppe und danach mit Z-Lys(Boc)-OSu erfolgende Umsetzung liefert das dünnschichtchromatographisch einheitliche und gut kristallisierende Pentapeptid Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH.

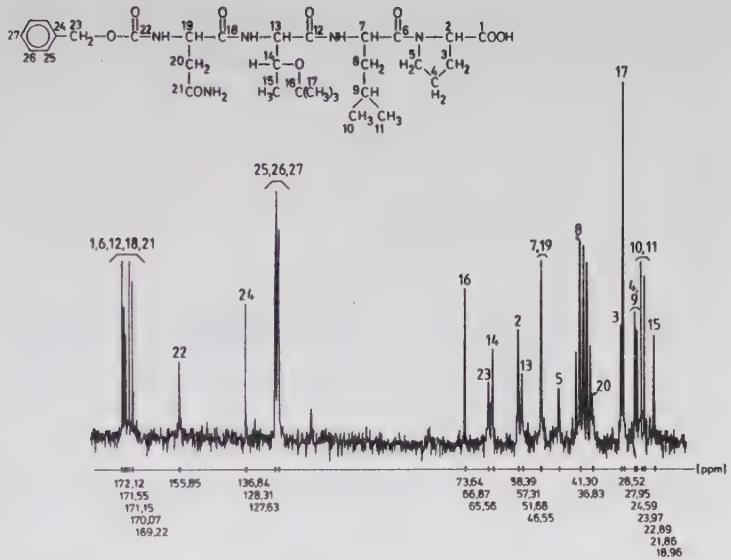


Abb. 14: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH, protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 200 mg in 1 ml DMSO.

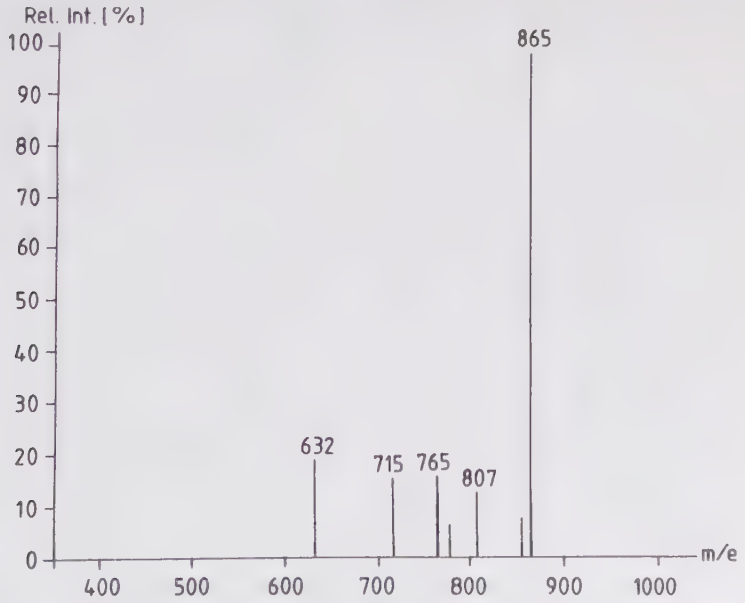


Abb. 15: Felddesorptionsmassenspektrum von Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH; Emitterheizstrom 12 mA.

Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen

m/e	Fragmentionen
865	$(M + 3H)^+$
807	865 - $(CH_3)_3CH$
765	865 - $(CH_3)_3C\text{-}O\text{-}C{\equiv}O^+$
715	M^+ - ($C_6H_5\text{-}CH_2^+$ und Isobutylen)
632	M^+ - H_3N-Leu-Pro-OH

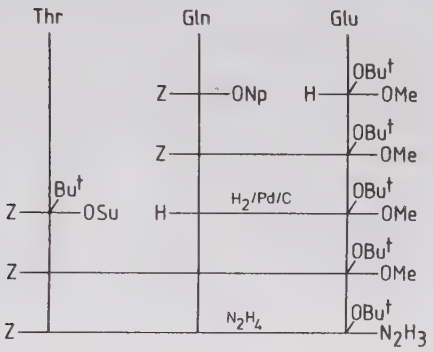
Um das kupplungsfähige Fragment H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH zu erhalten, wird die Z-Gruppe hydrogenolytisch entfernt.

In Tabelle 4 sind die physikalischen Daten der Peptidderivate zusammengestellt.

Tabelle 4: Physikalische Daten der einzelnen Peptidderivate

Verbindung	Ausbeute (% d. Th.)	Fp(°C)	α_D^{20-24}	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N
Adpoc-Leu-Pro-OMe	95	144	-50.0° (c=1, $CHCl_3$)	67.50 67.30	9.15 9.06	6.06 6.13
Leu-Pro-OMe·HCl	97	190	-54.0° (c=1, DMF)	51.70 51.72	8.32 8.27	10.05 10.25
Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe	80	Oel	-31.1° (c=1, $CHCl_3$)	63.02 63.36	8.12 8.18	7.87 7.83
Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	72	78-80	-55.2° (c=1, MeOH)	62.31 61.95	7.95 8.06	8.09 7.89
Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	68	121-123	-15.8° (c=0.5, DMF)	58.75 58.92	7.48 7.36	11.05 10.72
Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH·HCl	90	205-208	-8.9° (c=0.7, MeOH)	51.53 51.32	7.90 7.76	6.61 6.89
Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH	73	132-134	-10.8° (c=0.16, DMF)	58.52 58.49	7.83 8.02	11.37 11.09
Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH·HCl	91	158-161	-12.4° (c=0.05, MeOH)	53.43 52.19	8.18 8.36	12.83 11.98

IV. 3. 1. 2. Darstellung von Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3 (Fragment 22-24)



Syntheseschema 7: Darstellung von Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3

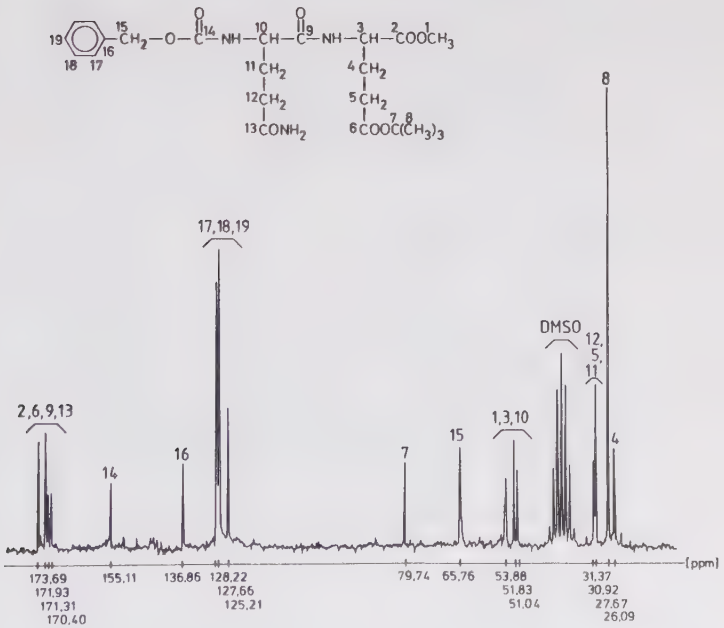


Abb. 16: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Gln-Glu(OBu^t)-OMe, protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 300 mg in 1.5 ml DMSO.

Zur Darstellung des Dipeptids Z-Gln-Glu(OBu^t)-OMe werden dieselben Vorsichtsmaßnahmen wie bei der Synthese von Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH getroffen. Der Aktivester Z-Gln-ONp läßt sich mit H-Glu(OBu^t)-OMe nur in mäßigen Ausbeuten zum vollgeschützten, dünnschichtchromatographisch einheitlichen Dipeptid umsetzen.

Die Verknüpfung von Z-Thr(Bu^t)-OSu mit dem von der Z-Gruppe befreiten Dipeptid H-Gln-Glu(OBu^t)-OMe gelingt in guter Ausbeute und ohne Nebenreaktionen.

Um Verseifungsschritte zu vermeiden wird der Tripeptidmethylester mittels Hydrazin in das sehr gut kristallisierende Hydrazid Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3 übergeführt.

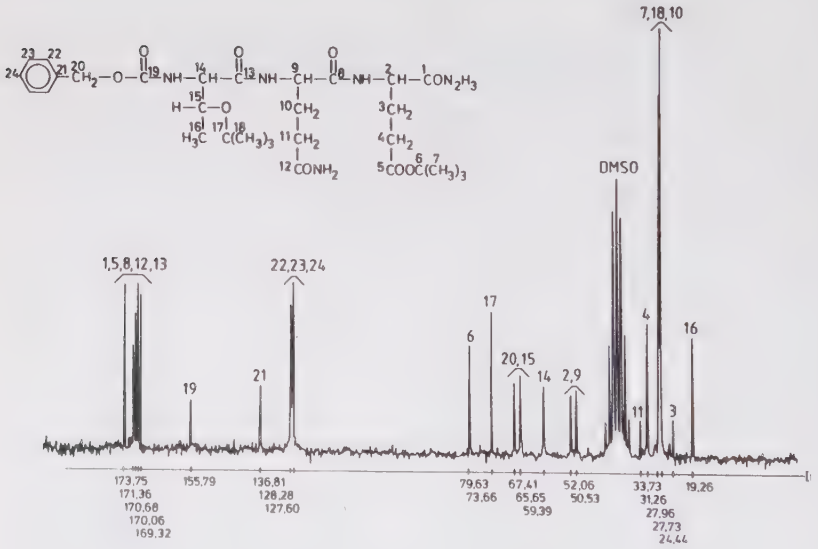
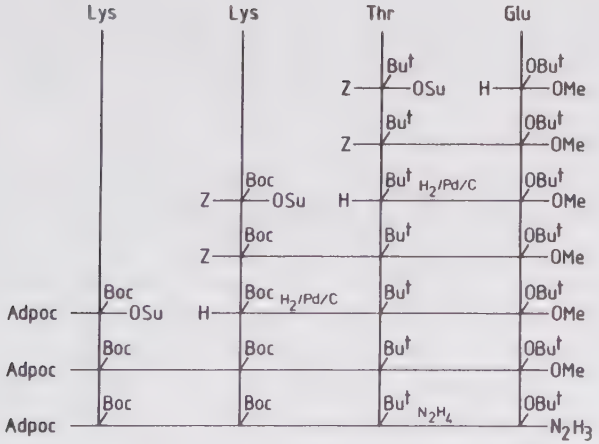


Abb. 17: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 250 mg in 1 ml DMSO.

Tabelle 5: Physikalische Daten der Peptidderivate

Verbindung	Ausbeute (% d. Th.)	Fp(°C)	α_D^{20-24}	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N
Z-Gln-Glu(OBu^t)-OMe	45	132-135	-18.5° (c=1, DMF)	57.61 57.51	6.94 6.68	8.76 8.94
Gln-Glu(OBu^t)-OMe·HCl	78	Oel	-5.8° (c=0.5, MeOH)	47.18 46.78	7.39 7.54	11.00 10.83
Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-OMe	75	98-101	-7.2° (c=0.5, DMF)	58.48 59.03	7.60 7.76	8.80 8.82
Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3	84	208-210	+7.4° (c=0.5, DMF)	56.59 56.78	7.60 7.91	13.19 13.12

IV. 3. 1. 3. Darstellung von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3 (Fragment 18-21)



Syntheseschema 8: Darstellung von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3

Das Tetrapeptid Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe wird schrittweise vom C-terminalen Ende nach der Aktivestermethode aufgebaut. Die Synthese des ersten Dipeptids gestaltet sich einfach und verläuft in guter Ausbeute zum dünnschichtchromatographisch einheitlichen Z-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe.

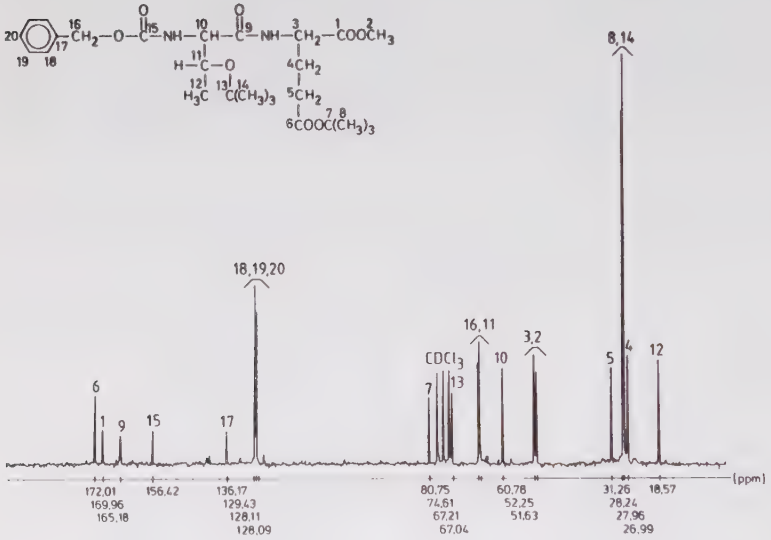


Abb. 18: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 300 mg in 1.5 ml $CDCl_3$.

Die Umsetzung von Z-Lys(Boc)-OSu mit dem Dipeptid H-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe, welchem zuvor die Z-Gruppe an Pd/C hydrogenolytisch entfernt wurde, liefert das vollständig geschützte Tripeptid Z-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe. Die Verlängerung zum gewünschten Tetrapeptid Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe erfolgt durch Umsetzung von Adpoc-Lys(Boc)-OSu mit H-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe. Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3 erhält man wie üblich durch die Reaktion von Hydrazin mit dem Tetrapeptidmethylester.

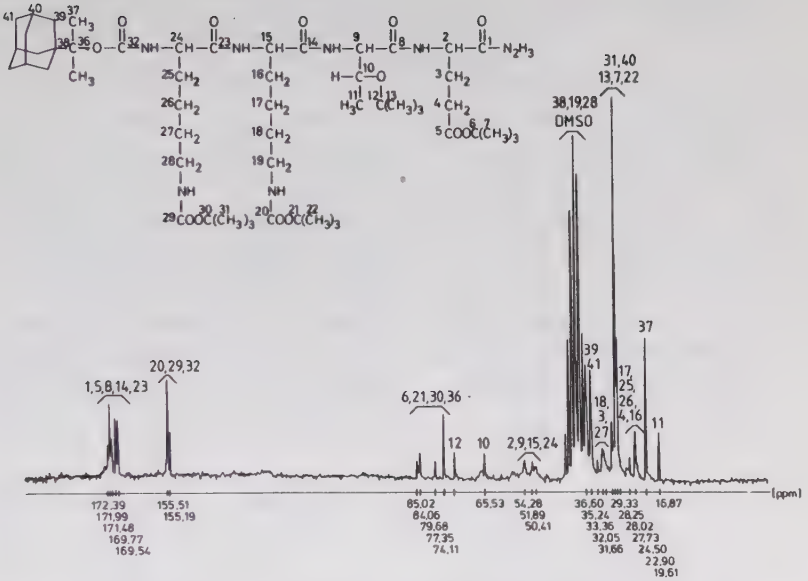
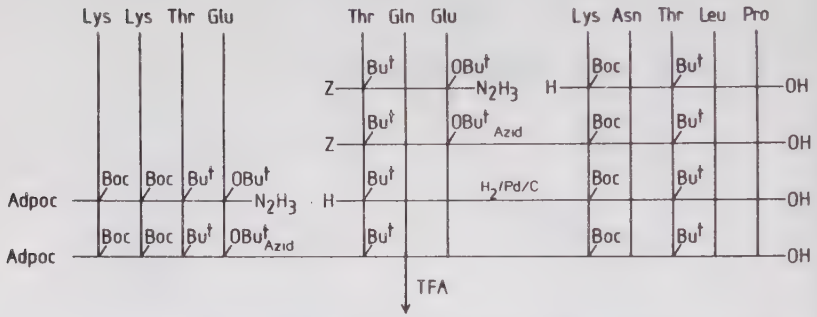


Abb. 19: ^{13}C-NMR-Spektrum von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3, protonenbreitbandentkoppelt, 22.63 MHz, 200 mg in 1.5 ml DMSO.

Tabelle 6: Physikalische Daten der Peptidderivate

Verbindung	Ausbeute (% d. Th.)	Fp(°C)	α_D^{20-24}	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N
Z-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe	78	107	-15.0° (c=0.5, DMF)	61.40 61.14	7.93 7.89	5.51 5.89
Z-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe	67	97-103	-9.1° (c=1, MeOH)	60.31 59.99	8.21 8.13	7.60 7.93
Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe·HCl	83	166-168	+3.5° (c=1, Dioxan)	54.49 53.43	8.67 8.74	8.76 9.05
Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-OMe	64	108-113	-2.7° (c=1, $CHCl_3$)	61.69 61.14	9.01 8.85	7.99 8.36
Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3	76	114-116	-7.8° (c=0.2, DMF)	60.55 60.63	9.01 8.80	10.65 10.96

IV. 3. 1. 4. Darstellung von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH



H-L-Lys-L-Lys-L-Thr-L-Glu-L-Thr-L-Gln-L-Glu-L-Lys-L-Asn-L-Thr-L-Leu-L-Pro-OH

Syntheseschema 9: Synthese von Thymosin ß9 (18-29)

Wie in Syntheseschema 9 beschrieben, wird das Tripeptidhydrazid durch Azidkupplung mit 4N HCl in Dioxan und tert.-Butylnitrit mit dem Pentapeptid zum Octapeptid Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH in 61%iger Ausbeute verlängert. Die Reinigung gelingt durch zweimaliges Umkristallisieren aus DMF/Wasser. Das so erhaltene, dünnschichtchromatographisch einheitliche Octapeptid wird an Pd/C innerhalb von 6 h hydrogenolytisch von der Z-Gruppe befreit. Durch eine weitere Azidkupplung (4N HCl in Dioxan und tert.-Butylnitrit bei -15 °C) wird nun Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3 mit dem freigesetzten Amin in 58%iger Ausbeute zum geschützten Dodecapeptid umgesetzt. Dieses Dodecapeptid ist noch geringfügig mit nicht umgesetztem Tetrapeptidhydrazid verunreinigt. Auf eine weitere Reinigung wird jedoch verzichtet, da nur noch die Abspaltung der gesamten Schutzgruppen vom Peptid bevorsteht und es somit sinnvoll erscheint, erst das freigesetzte Thymosin ß9 (18-29) zu reinigen.

IV. 3. 1. 5. Abspaltung der Schutzgruppen und Reinigung von Thymosin ß9 (18-29)

Die Freisetzung des geschützten Dodecapeptids gestaltet sich, dadurch daß es sich ausschließlich um säurelabile Gruppen handelt, recht einfach. Innerhalb 1 Stunde kann das geschützte Peptid mit konzentrierter Trifluoressigsäure vollständig deblockiert werden. Nach Überführen des Peptids in die Acetatform mittels Ionenaustauscher (Amberlite IRA 400, Acetatform), wird das Thymosin ß9 (18-29) mit 2N Essigsäure als Elutionsmittel an Sephadex G-25 (Superfine) weitergereinigt. Das so erhaltene Thymosin ß9 (18-29) wird mit HPLC auf analytische Reinheit geprüft. Die physikalischen Daten sind in Arbeitsvorschrift V. 11. 4. 4. aufgeführt.

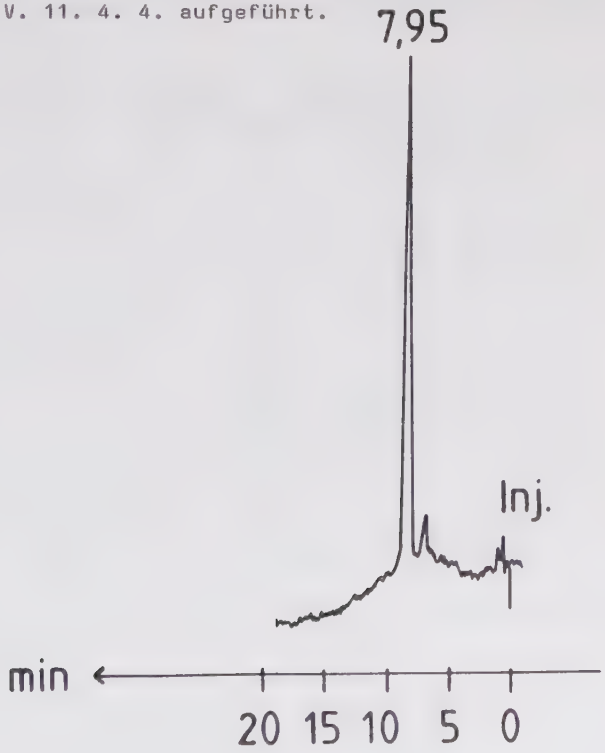
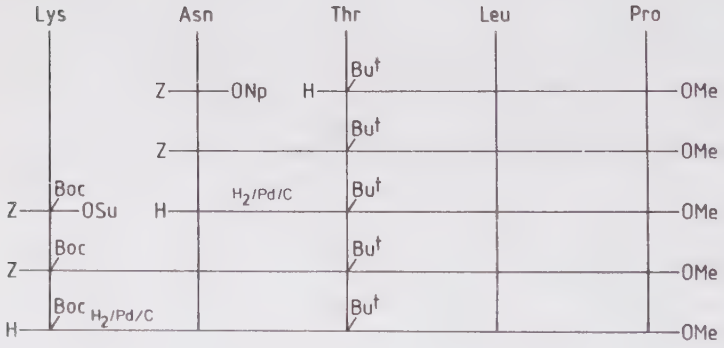


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm von Thymosin ß9 (18-29); Säule: 4.6 x 60 mm Shandon Octadecylsilan 3 µm; Eluent A: 5 mMol Tetrabutylammoniumhydroxid, 5 mMol NaH_2PO_4 (pH 8.0); Eluent B: MeOH; Gradient von 0% B mit 1.5% B pro Minute (linear); Durchflußrate: 1 ml/Min; Detektion bei 220 nm.

IV. 3. 2. Synthese von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe (geschütztes Thymosin β9 (18-29))

Mit der Synthese des geschützten Dodecapeptids soll die Möglichkeit geschaffen werden, dieses je nach Bedarf zum einen in N-terminaler, zum anderen in C-terminaler Richtung zu verlängern. Mittels Hydrazinolyse kann der Dodecapeptidmethylester in das entsprechende Hydrazid übergeführt werden und steht damit einer Azidkupplung zur Verfügung. Andererseits kann das Dodecapeptid durch selektive Deblockierung der Adpoc-Schutzgruppe in das freie Amin übergeführt werden, so daß sich ebenfalls eine Möglichkeit der Weiterkondensation bietet.

IV. 3. 2. 1. Darstellung von H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe (Fragment 25-29)



Syntheseschema 10: Darstellung von H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe.

Die Synthese lehnt sich eng an die erfolgreiche Darstellung von H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH an.
Als erstes wird das Tripeptid Z-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe entacyliert und nachfolgend mit Z-Asn-ONp zu vollständig geschütz-

ten Tetrapeptid Z-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe verlängert. Die Entfernung des entstehenden Nitrophenols gestaltet sich hierbei recht einfach, da dies durch mehrmaliges Waschen mit 20%-iger Na_2CO_3-Lösung gelingt. Weitere Umsetzung von Z-Lys(Boc)-OSu mit H-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe, welches zuvor von der Z-Gruppe befreit wurde, führt zu dem dünnschichtchromatographisch einheitlichen und gut kristallisierenden Pentapeptid Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe.

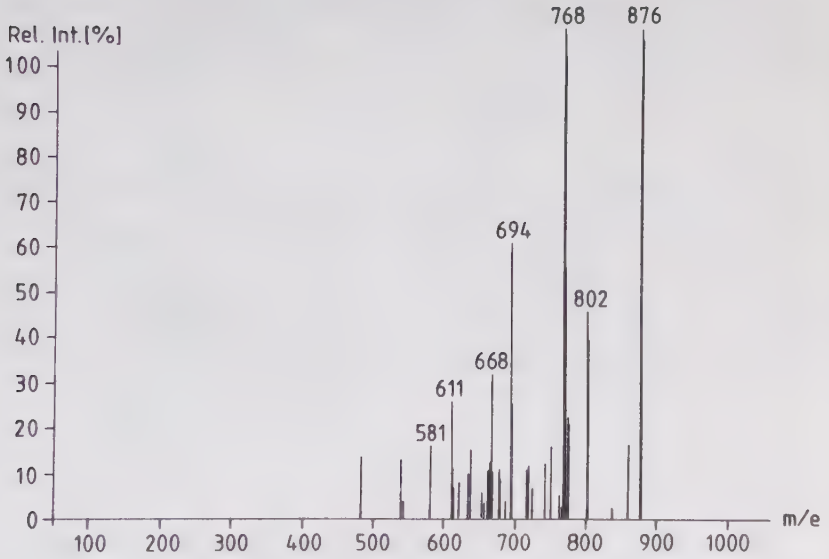


Abb. 21: Felddesorptionsmassenspektrum von Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe; Emitterheizstrom 15 mA.

Charakterisierung der Ionenfragmente

m/e	Fragmentionen
876	M^+
802	M - tert.-Butanol
768	M - Benzylalkohol
694	768 - tert.-Butanol

m/e	Fragmentionen
668	768 - $(CH_3)_3C-O-C\equiv O^+$
611	668 - tert.-Butyl

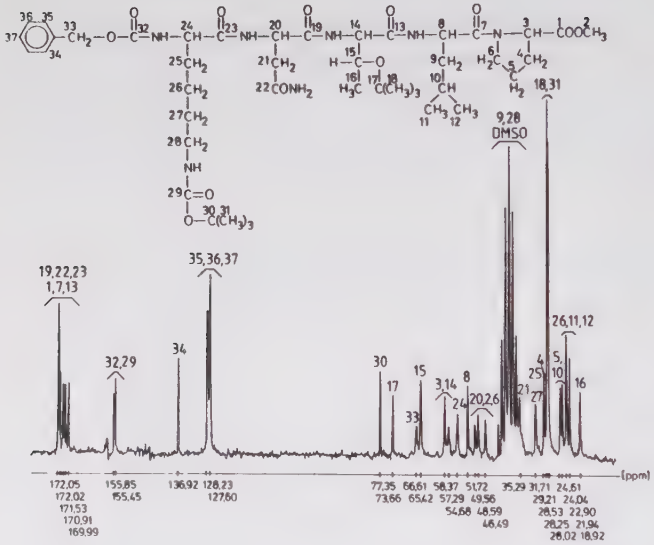
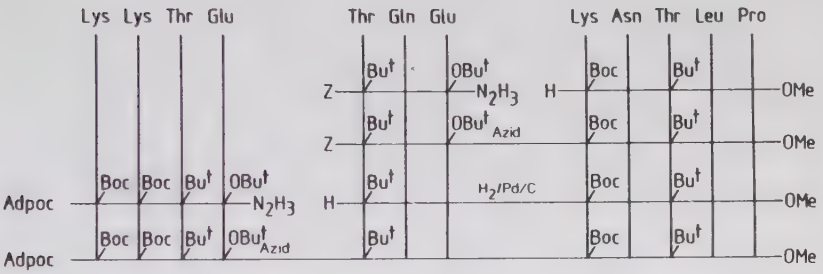


Abb. 22: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe, protonenbreitbandentkoppelt, 20.115 MHz, 200 mg in 1.5 ml DMSO.

Hydrierung von Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe liefert die für die weitere Kondensation benötigte Aminkomponente.

IV. 3. 2. 2. Darstellung des geschützten Thymosin β9 (18-29)



Syntheseschema 11: Darstellung von Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe.

Wie aus Syntheseschema 11 zu ersehen ist, kann das geschützte Dodecapeptid mittels zweier Azidkupplungen, analog Syntheseschema 9, dargestellt werden.

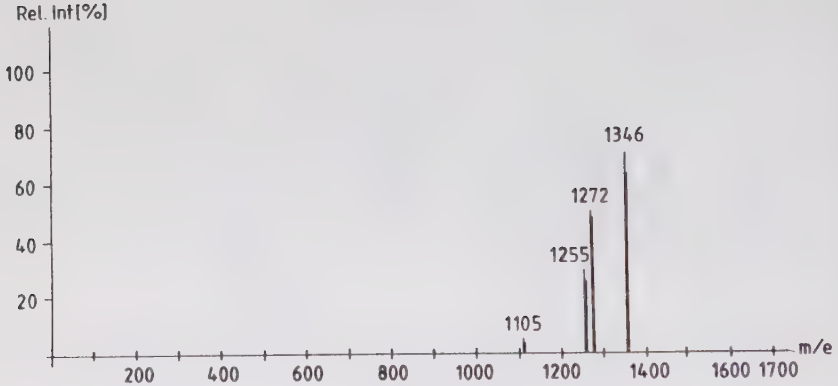


Abb. 23: Felddesorptionsmassenspektrum von Z-Thr(Bu^t)-Gln-Glu(OBu^t)-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OMe, Emitterheizstrom 12 mA.

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

m/e	Fragmentionen
1347	M^+
1272	M - tert.-Butanol
1255	M - C_6H_5-CH_2^+
1105	M - (Leu-Pro-OMe)$^+$

In Tabelle 7 sind die physikalischen Daten der synthetisierten Peptidderivate aufgeführt.

Tabelle 7: Physikalische Daten der Peptidderivate

Verbindung	Ausbeute (% d. Th.)	Fp(°C)	α_D^{20-24}	Oben Ber. Unten Gef. C	H	N
Thr(But)-Leu-Pro-OMe	97	74-75	-98.9° (c=1, MeOH)	60.13 59.95	9.33 9.26	10.52 10.41
Z-Asn-Thr(But)-Leu-Pro-OMe	82	188-192	-36.0° (c=1, DMF)	59.33 59.38	7.63 7.52	10.81 10.75
Z-Lys(Boc)-Asn-Thr(But)-Leu-Pro-OMe	83	129-130	-28.1° (c=1, DMF)	58.95 59.08	7.94 8.06	11.19 10.97
Lys(Boc)-Asn-Thr(But)-Leu-Pro-OMe·HCl	71	228-231	-18.9° (c=0.09, DMF)	54.01 53.36	8.29 7.87	12.60 11.67
Z-Thr(But)-Gln-Glu(OBut)-Lys(Boc)-Asn-Thr(But)-Leu-Pro-OMe	67	194-198	-8.1° (c=0.16, DMF)	57.98 57.52	8.01 7.95	11.44 11.17
Thr(But)-Gln-Glu(OBut)-Lys(Boc)-Asn-Thr(But)-Leu-Pro-OMe·HCl	93	208-212	-14.0° (c=0.05, MeOH)			
Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(But)-Glu(OBut)-Thr(But)-Gln-Glu(OBut)-Lys(Boc)-Asn-Thr(But)-Leu-Pro-OMe	78	109-112	-3.1° (c=0.08, DMF)	59.20 60.07	8.62 8.72	10.67 10.27

IV. 4. Biologische Aktivitätsuntersuchungen

Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36), Thymopoietin (32-36) und Thymosin β9 (18-29) werden bezüglich ihrer Effekte auf die DNS-Syntheserate und Proliferation von humanen diploiden Fibroplasten und Tumorzellen (Melanom, Wish, Seromed München) in Zellkulturen gemessen. Sämtliche Zellkulturen durchlaufen einen Testzyklus[261], der sich aus zwei Wachstumsphasen und einer Minimalphase zusammensetzt. In der Minimalphase werden die Testsubstanzen zugesetzt.

Wachstumsphase 1: Die unter flüssigem Stickstoff aufbewahrten Zellen werden bei 37° aufgebaut und in Kulturflaschen zusammen

mit MEM-H-Medium (Instamed, Seromed, München) mit Zusätzen von Penicillin, Streptomycin, Neomycin und 10% fötalem Kälberserum (FKS) bei 37° inkubiert. Nach 2 Tagen werden die Zellen nach Trypsinierung optisch gezählt und erneut eingesät (2×10^6-Zellen pro Flasche).

Wachstumsphase 2: Nach täglichem Mediumwechsel wird am 4. Tag wiederum die Zellzahl bestimmt und 0.5×10^6 Zellen/10 ml MEM + 10% FKS in je 30 ml pro Kulturflasche eingesät.

Minimalphase: Nach 24 h wird das Medium abgesaugt und ein Minimalmedium mit reduziertem Serumzusatz (diploide Zellen: 1%; heteroploide Zellen: 0.25%) zugegeben.

Testphase: Nach 48 h erfolgt die Präparatzugabe, wobei in den vorliegenden Versuchen 50 µl Präparation (10^{-5} g/ml Peptid in Zitratphosphatpuffer, pH 7.2) pro Flasche eingegeben werden. Für jede Präparateart und -konzentration werden pro Versuch 3 Parallelproben angesetzt. Die Inkubation wird auf 8 h begrenzt 4 h vor dem Ende dieser Wirkzeit werden jeweils 50 µl Methyl-^{3}H-Thymidin-Lösung (0.35 µCi) hinzupipettiert. Nach 8 h wird das nicht eingebaute Thymidin durch viermaliges Waschen mit je 5 ml 2%iger Perchlorsäure entfernt und die Zellen mit 1N HCl bei 70 °C 1 h hydrolisiert. Das Hydrolysat wird in Scintillationsfläschchen überführt und mit Cocktail (Aquasol 2, NEN) gemischt. Die Aktivitätsmessung erfolgt in einem Beckman LS 100 Liquid Scintillation Counter. Hierbei wird die Probe mit Präparat mit derjenigen ohne Präparat verglichen. Die relativen Standardabweichungen des gesamten Testsystems betragen $\pm$ 10%.

In diesem Testsystem zeigen weder Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36), Thymopoietin (32-36) noch Thymosin ß9 (18-29) eine signifikante Hemmung des Tumorzellwachstums bei gleichzeitiger Stimulierung des Wachstums humaner diploider Fibroblasten. Alle vier synthetisierten Peptide sind demnach in diesem Testversuch biologisch inaktiv.

V. EXPERIMENTELLER TEIL

V. 1. Spektroskopische Methoden

V. 1. 1. Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der PFT-$^{13}C(^{1}H)$-NMR-Spektren erfolgte mit einem Bruker HFX-90-Multikerngerät (22.628 MHz für ^{13}C) und einem WP-80-NMR-Spektrometer (20.115 MHz) ebenfalls von der Fa. Bruker, Karlsruhe. Die Spektren wurden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (2.5-2.5 µ; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28 Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Es wurden ungefähr 200-300 mg der zu messenden Substanz in jeweils 1.0-1.5 ml des entsprechenden Lösungsmittels aufgelöst.

V. 1. 2. Massenspektrometrie

Die Elektronenstoß-Massenspektren wurden mit dem Gerät MAT 711 der Fa. Varian, Bremen, gemessen (Direkteinlaß, 70 eV Elektronenenergie, Ionenquelltemperatur bis 250 °C). Die Felddesorptions-Massenspektren wurden mit einer FD-Ionenquelle desselben Gerätetyps aufgenommen. Die Emitterheizströme sind in den einzelnen Massenspektren angegeben.

V. 1. 3. Drehwerte

Die Drehwerte wurden mit einem Zeiss OLD-5-Polarimeter bei 578, 546, 436, 405 und 365 nm gemessen. Die $[\alpha]_D$-Werte wurden durch graphische Extrapolation ermittelt. Ein Teil der Drehwerte wurde auf einem Perkin-Elmer 141 Polarimeter gemessen, wobei der $[\alpha]_D$-Wert direkt abgelesen werden kann.

V. 1. 4. Infrarotspektroskopie

Für die Aufnahme der IR-Spektren wurden KBr-Presslinge hergestellt. Die Einwaage betrug 1.5 mg/300 mg KBr. Die Aufnahme erfolgte mit den Spektrographen 2021 und 021 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen.

V. 2. Chromatographische Methoden

Alle dargestellten Verbindungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von DC-Fertigplatten der Fa. Merck, Darmstadt, auf Einheitlichkeit überprüft. Folgende Fließmittelsysteme fanden Verwendung:

A: n-Butanol/Eisessig/Wasser	3:1:1
B: Hexan/tert.-Butanol/Pyridin	5:1:1
C: Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser	60:45:6:14
D: Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser	8:8:8:1
E: Chloroform/Methanol	98:2
F: Chloroform/Methanol/25% NH_3-Lösung	12:9:4
G: Essigester/(Pyridin/Eisessig/Wasser 20:6:11)	6:4
H: Chloroform/Methanol/Eisessig	90:8:2
I: Petrolether (30-50 °C)/Essigester	3:2
J: n-Butanol/Essigester/Eisessig/Wasser	1:1:1:1
K: n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser	5:5:1:4
L: Essigester/Pyridin/Eisessig/Wasser	18:3:1:2
M: n-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin	30:3:12:10

Die Chromatogramme wurden zum einen in der Jodkammer entwickelt, zum anderen mit Ninhydrinlösung[262], Chlor-Tolidin Lösung[263] besprüht und auf 120 °C erwärmt. Argininhaltige Verbindungen wurden mit Sakaguchi-Reagens[264] entwickelt.

V. 3. Sonstiges

Die Schmelzpunkte wurden auf einer Schmelzpunktsbestimmungsapparatur nach Dr. Tottoli der Fa. Büchi, Flavil, Schweiz, gemessen und sind nicht korrigiert.

Eine Gerätekombination (pH-Meter E 512 und Impulsomat E 73) der Fa. Metrohm, Schweiz, diente zur Messung des pH-Wertes und als pH-Stat.

Die Aminosäureanalysen wurden am Beckmann Unichrom Analysator bzw. einem automatischen Biotronik Chromatographiesystem LC 6000 E durchgeführt. Vor Auftragen der Probenlösungen wurden die Proben mindestens 18 h mit 6N HCl bei 120 °C hydrolisiert.

Der prozentuale Anteil an D-Aminosäuren wurde durch Gaschromatographie (Gerät Carlo Erba 3900) an chiraler Phase der N-(Pentafluorpropionyl)aminosäureisopropylester ermittelt.

V. 4. Chemikalien

Lösungsmittel wurden nach üblichen Vorschriften[265] getrocknet und anschließend über eine 140 cm Vigreux-Kolonne unter Feuchtigkeitsausschluß destilliert. Aufbewahrung der Lösungsmittel erfolgte über Molekularsieben (Fa. Merck, Darmstadt, 3 bzw 4 Å).

Sämtliche Aminosäuren wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen und hatten ausschließlich - mit Ausnahme von Glycin - L-Konfiguration. Adamantancarbonsäure, N^{α}, N^{ω}, N^{δ}-Tris-(benzyloxycarbonyl)-L-arginin und L-Tyrosin-tert.-butylester wurden von der Fa. Bachem, Bubendorf, Schweiz, und N-Hydroxisuccinimid von der Fa. Senn-Chemicals, Dielsdorf, Schweiz, bezogen.

Folgende Ausgangsverbindungen wurden nach Literaturangaben synthetisiert: tert.-Butyloxycarbonylazid aus Carbazinsäure-tert.-butylester und Natriumnitrit in Eisessig[238]; Benzyloxycarbonylchlorid aus Benzylalkohol und Phosgen[266]; 1-Hydroxybenzotriazol nach Vorschrift[267] aus o-Nitrochlorbenzol und Hydrazinhydrat; p-Methoxybenzosulfonylchlorid (Mbs-Cl) aus Anisol und Chlorsulfonsäure[268]. Fluorameisensäure-<1-(1-adamantyl)-1-methylethyl>-ester (Adpoc-F)[246] wurde in folgenden Schritten dargestellt: Umsetzung von Adamantan-1-carbonsäure mit Thionylchlorid/Ethanol oder Phosphorpentachlorid/Ethanol zum Adamantancarbonsäureethylester; dieser wurde mit Grignard-Reagens (aus Methyljodid und Magnesium) zum tertiären Alkohol, 2-(1-Adamantyl)-2-propanol umgesetzt. Die Umsetzung des Alkohols mit dem leicht zugänglichen Fluorcarbonylchlorid [266] liefert den Fluorameisensäure-<1-(1-adamantyl)-1-methylethyl>-ester. α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonylazid (Ddz-N_3) wird nach Vorschrift [241] synthetisiert.

Zur Berechnung der Molekulargewichte wurden folgende Atomgewichte verwendet: C = 12.011, H = 1.008, Cl = 35.453, F = 18.998, O = 15.999 und S = 32.064.

V. 5. Synthese des geschützten Thymopoietin (32-36) nach Syntheseweg 1, (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 5. 1. O-tert.-Butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

V. 5. 1. 1. 1. L-Tyrosin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Tyr-OMe·HCl)

H-L-Tyr-OMe·HCl wird mit 91% Ausbeute nach Zitat[269] hergestellt. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Fp.: 191-192 °C, Lit 190 °C

$[\alpha]_D^{22}$: + 10.6° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: + 12.9° (c=2, MeOH)

$C_{10}H_{14}ClNO_3$ (231.68) Ber.: C 51.84 H 6.09 N 6.05 Cl 15.30
Gef.: C 51.80 H 6.19 N 6.04 Cl 15.70

V. 5. 1. 1. 2. N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosin-methylester (Z-L-Tyr-OMe)

Z-L-Tyr-OMe wird dargestellt in 83%iger Ausbeute nach Zitat[270]. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Fp.: 90 °C, Lit. 92-93 °C

$[\alpha]_D^{21.5}$: - 32.5° ± 0.5° (c=2, DMF)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{22}$: - 32,7° (c=2.2, DMF)

$C_{18}H_{19}NO_5$ (329.35) Ber.: C 65.64 H 5.82 N 4.25
Gef.: C 65.47 H 5.85 N 4.14

V. 5. 1. 1. 3. L-Tyrosin-ethylester·Hydrochlorid (H-L-Tyr-OEt·HCl)

H-L-Tyr-OEt·HCl wird nach Brenner et al[271] mit 85.8% Ausbeute synthetisiert. In System A und D einheitlich.

Fp.: 165 °C, Lit. 170-171 °C

$[\alpha]_D^{21.5}$: - 27.5° ± 0.5° (c=2, EtOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 28,9° (c=1.98, EtOH)

$C_{11}H_{16}ClNO_3$ (245.71) Ber.: C 53.77 H 6.56 N 5.70 Cl 14.43
Gef.: C 53.47 H 6.71 N 5.84 Cl 14.82

V. 5. 1. 1. 4. N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosin-ethylester (Z-L-Tyr-OEt)

Die Darstellung erfolgt aus H-L-Tyr-OEt·HCl und Z-Cl nach Wünsch et al[272] mit 97% Ausbeute. Chromatographisch rein in den Systemen A, B, D und H.

Fp.: 92-93 °C, Lit. 88-91 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 3.9° ± 0.5° (c=2, EtOH)

$C_{19}H_{21}NO_5$ (343.38) Ber.: C 66.46 H 6.17 N 4.08
Gef.: C 66.37 H 6.39 N 4.02

V. 5. 1. 2. N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosin (Z-L-Tyr-OH)

Die Verseifung gelingt innerhalb 30 Minuten sowohl von Z-L-Tyr-OMe (a) als auch von Z-L-Tyr-OEt (b). Beide Verseifungen liefern einheitliche Produkte in den Systemen A und D.

Ausbeute: a) 91%, b) 89%
Fp.: a) 91-94 °C, b) 94-95 °C, Lit. 92-95 °C [272]

a) $[\alpha]_D^{21}$: + 10.7° ± 0.5° (c=2, HAc)

b) $[\alpha]_D^{21}$: + 10.9° ± 0.5° (c=1.94, HAc)

$C_{17}H_{17}NO_5$ (315.33) Ber.: C 64.75 H 5.43 N 4.44
Gef.: a) C 64.44 H 5.51 N 4.39
b) C 64.39 H 5.38 N 4.42

V. 5. 1. 3 O-tert.-Butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

45.0 g (143 mMol) Z-L-Tyr-OH werden in der Kälte in 900 ml absolutem CH_2Cl_2 suspendiert. Zu dieser Suspension fügt man 600 ml Isobutylen sowie 23.5 ml kalte konz. H_2SO_4 hinzu. Nach 7 d wird die Reaktionslösung mehrmals mit kalter 10-proz.

Na_2CO_3-Lösung ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Phasen werden zweimal mit CH_2Cl_2 extrahiert; die gesammelten organischen Phasen werden danach mit Wasser neutral gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Eindampfen wird der ölige Rückstand mehrmals mit lauwarmen n-Hexan digeriert. Die gesammelten n-Hexanphasen werden eingedampft (Rotationsverdampfer) und man erhält 45.5 g (74%) öliges, dünnschichtchromatographisch einheitliches (System A, D und H) Z-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t. Diese 45.5 g (106 mMol) werden in 150 ml absolutem EtOH gelöst und mit 2.6 g Pd(10%)/C versetzt. Nach 7 h wird der Katalysator abfiltriert, das Filtrat auf ca. 40 ml eingeengt und mit 1N HCl/CH_2Cl_2 (1:1) versetzt. Die abgetrennte CH_2Cl_2-Phase wird nochmals mit 1N HCl-Lösung geschüttelt, abgetrennt und über Na_2SO_4 getrocknet. Anschließend wird zur Trockene eingeengt, in wenig EE aufgenommen und mit Ether versetzt. Im Kühlschrank aufbewahrt, fällt H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl innerhalb ca. 15 h als weiße lange Nadel an. Einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 21.5 g (61.4% d. Th.)
Fp.: 161 °C, Lit. 159-160 °C[243)]

$[\alpha]_D^{25}$: + 37.6° ± 0.5° (c=3.02, EtOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: + 41.0° (c=3.14, EtOH)

Racemattest: 0.1% D-Tyr

$C_{17}H_{28}ClNO_3$ (329.87) Ber.: C 61.90 H 8.56 N 4.25 Cl 10.75
Gef.: C 61.61 H 8.56 N 4.08 Cl 10.25

V. 5. 2. Benzyloxycarbonyl-L-valin (Z-L-Val-OH)

Z-L-Val-OH wird nach Schröder et al[269)] aus Valin und Z-Cl in 85.6%iger Ausbeute synthetisiert. Einheitlich in den Systemen A und D.

Fp.: 59-62 °C, Lit. 57-61 °C

$[\alpha]_D^{23}$: + 1.7° ± 0.5° (c=4.5, EtOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: + 1.5° (c=5, EtOH)

$C_{13}H_{17}NO_4$ (251.28) Ber.: C 62.14 H 6.82 N 5.57
Gef.: C 62.19 H 6.99 N 5.73

V. 5. 3 Benzyloxycarbonyl-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

1.26 g (5 mMol) Z-L-Val-OH, 1.65 g (5 mMol) H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, o.55 ml (5 mMol) N-Methylmorpholin und 675 mg (5 mMol) HOBt werden in 25 ml DMF gelöst und auf -12 °C gekühlt. Nach 15 Min. fügt man vorgekühltes, in DMF gelöstes DCCI (1.13 g, 5.5 mMol) hinzu und läßt danach 24 Std. reagieren. Anschließend wird die Reaktionslösung auf -5 °C gekühlt, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff befreit und am Hochvakuum eingeengt. Den Rückstand nimmt man in EE auf, wäscht die EE-Phase mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit H_2O (1x), mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung (3x) und mit Wasser bis zur Neutralität. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird eingeengt bis ein farbloses Oel zurückbleibt. Kristallisationsversuche schlugen fehl. Die Verbindung ist chromatographisch in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 2.0 g (78% d. Th.)
Fp.: Oel
$[\alpha]_D^{21}$: + 16.2° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{30}H_{42}N_2O_6$ (526.67) Ber.: C 68.42 H 8.04 N 5.32
Gef.: C 68.17 H 7.92 N 5.28

V. 5. 3. 1 L-Valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

1.5 g (2.85 mMol) Z-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden in 100 ml Methanol und 5 ml Wasser gelöst, mit 150 mg Pd(10%)/C versetzt und bei pH 5.2 (Zugabe von methanolischer HCl mittels Autotitrator) 3 Std. im Durchflußverfahren hydriert. Danach wird abfiltriert, das Filtrat mehrmals mit Methanol eingeengt und aus Methanol/Ether/Petrolether (40-60 °C) gefällt. Chromatographisch rein im System D.

Ausbeute: 1.15 g (94.3% d. Th.)

Fp.: 217-219 °C

$[\alpha]_D^{22}$: + 42.0° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{22}H_{37}ClN_2O_4$ (429.00) Ber.: C 61.59 H 8.69 Cl 8.26 N 6.53
Gef.: C 61.21 H 8.80 Cl 8.61 N 6.42

V. 5. 4. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-β-tert.-butylester·Dicyclohexylammonium (Z-L-Asp(OBu^t)-OH·DCHA)

V. 5. 4. 1. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure (Z-L-Asp-OH)

Z-L-Asp-OH wird nach Bergmann et al[273] in 72%iger Ausbeute synthetisiert. Einheitlich in den Systemen A, D und H.

Fp.: 113-114 °C, Lit. 116 °C

$[\alpha]_D^{20}$: + 9.65° ± 0.5° (c=2, HAc)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: + 9.5° (c=2, HAc)

$C_{12}H_{13}NO_6$ (267.24) Ber.: C 53.93 H 4.90 N 5.24
Gef.: C 53.94 H 4.87 N 5.29

V. 5. 4. 2. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäureanhydrid (Z-L-Asp-$\overline{O}$)

Das Anhydrid wird aus Z-L-Asp-OH nach John et al[274] mit 100% Ausbeute dargestellt. Einheitlich in System A und System D.

Fp.: 109-110 °C, Lit.: 110 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 37° ± 0.5° (c=2.5, HAc)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{15}$: - 38.6° (c=2.25, HAc)

$C_{12}H_{11}NO_5$ (249.22) Ber.: C 57.93 H 4.45 N 5.62
Gef.: C 57.34 H 4.76 N 5.82

V. 5. 4. 3. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-α-p-nitrobenzylester (Z-L-Asp-α-ONb)

Die Darstellung des Esters erfolgt nach der Methode von Schröder et al[275] in 69%iger Ausbeute. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Fp.: 125-126 °C, Lit. 124-125 °C

$[\alpha]_D^{25}$: - 16.5° ± 0.5° (c=1, HAc)

$[\alpha]_{D.\ Lit.}^{25}$: - 17.8° (c=1, 95% HAc)

$C_{19}H_{18}N_2O_8$ (402.36) Ber.: C 56.72 H 4.51 N 6.96
Gef.: C 56.68 H 4.54 N 6.99

V. 5. 4. 4. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-ß-tert.-butylester-α-p-nitrobenzylester (Z-L-Asp(OBu^t)-α-ONb)

Die Darstellung der Verbindung erfolgt durch Umsetzung von Isobutylen mit Z-L-Asp-α-ONb nach Schröder et al[275] mit 82% Ausbeute. Einheitlich in den Systemen A, D und H.

Fp.: 95-95.5 °C, Lit. 93-94 °C

$[\alpha]_D^{25}$: - 16.2° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: - 16.6° (c=1, MeOH)

$C_{23}H_{26}N_2O_8$ (458.47) Ber.: C 60.26 H 5.72 N 6.11
Gef.: C 60.36 H 5.80 N 6.04

V. 5. 4. 5. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure-ß-tert.-butylester·Dicyclohexylammonium (Z-L-Asp(OBu^t)-OH·DCHA)

Es wird Z-L-Asp(ß-OBu^t)-α-ONb nach Zitat 275 in 99%iger Ausbeute zum Z-L-Asp(ß-OBu^t)-OH verseift und anschließend in das Dicyclohexylammoniumsalz überführt. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Fp.: 125-126 °C, Lit. 125-126.5 °C

$[\alpha]_D^{25}$: + 12.9° ± 0.5° (c=2, EtOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: + 12.8° (c=2, EtOH)

$C_{28}H_{44}N_2O_6$ (504.67) Ber.: C 66.64 H 8.79 N 5.55
Gef.: C 66.46 H 8.81 N 5.69

V. 5. 5. N-Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

Man löst 1.9 g (5.9 mMol) Z-L-Asp(ß-OBu^t)-OH (freigesetzt mit Citronensäure aus 3.0 g (5.95 mMol) Z-L-Asp(ß-OBu^t)-OH·DCHA), 2.5 g (5.8 mMol) H-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, 800 mg (5.9 mMol) HOBt und 1.6 ml (13.8 mMol) N-Methylmorpholin in 75 ml DMF und kühlt auf -10 °C ab. Nach Erreichen der Temperatur fügt man 1.33 g (6.5 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem DMF, hinzu und läßt insgesamt 18 h reagieren. Danach wird in der Kälte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff befreit und das Filtrat im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit Wasser (1x), mit 15%iger $NaHCO_3$-Lösung (3x) und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird filtriert, das Filtrat etwas eingeengt und das geschützte Tripeptid durch Zugabe von Ether/Hexan gefällt. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 3.5 g (85% d. Th.)
Fp.: 155-156 °C

$[\alpha]_D^{25.5}$: - 6.2° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{38}H_{55}N_3O_9$ (697.87) Ber.: C 65.40 H 7.94 N 6.02
Gef.: C 65.23 H 8.07 N 6.11

V. 5. 5. 1. L-Asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

3.0 g (4.32 mMol) Z-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden in Methanol und wenig Wasser gelöst. Nach Zugabe von 300 mg Pd(10%)/C wird 50 Minuten bei pH 3.9 (Zugabe methanolischer HCl mittels Autotitrator) entacyliert. Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat mehrmals mit Methanol eingeengt, in Ether aufgenommen und mit Petrolether (30-50 °C) gefällt. Einheitlich im System D.

Ausbeute: 2.3 g (90% d. Th.)
Fp.: 123-124 °C

$C_{30}H_{50}ClN_3O_7$ (600.20) Ber.: C 60.03 H 8.40 Cl 5.91 N 7.00
Gef.: C 59.87 H 8.55 Cl 6.18 N 6.79

V. 5. 6. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.butyloxycarbonyl-L-lysin·Dicyclohexylammonium (Z-L-Lys(Boc)-OH·DCHA)

V. 5. 6. 1. N^{ϵ}-Benzyliden-L-lysin (H-L-Lys(Bal)-OH)

437 g (2.4 Mol) Lysin·Hydrochlorid werden unter Stickstoffatmosphäre in 1.2 ltr 2N LiOH-Lösung unter kräftigem Rühren gelöst. Die Reaktionslösung wird auf 1 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man 254 ml (2.5 Mol) frisch destillierten Benzaldehyd, so daß die Temperatur stets unter 4 °C bleibt. Nach vollständiger Zugabe des Benzaldehyds beläßt man die Reaktionsmischung 24 h bei 3-5 °C. Danach wird mit 700 ml kaltem Ethanol verdünnt und filtriert. Der Rückstand wird in 350 ml kaltem Ethanol suspendiert und nochmals filtriert. Der Rückstand wird über P_2O_5 im Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 432.8 g (77.2% d. Th.)
Fp.: 182-186 °C, Lit. 203-206 °C[276)]

$C_{13}H_{18}N_2O_2$ (234.30) Ber.: C 66.64 H 7.74 N 11.96
Gef.: C 64.61 H 7.50 N 11.27

V. 5. 6. 2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-lysin (Z-L-Lys-OH)

120.0 g (512 mMol) H-L-Lys(Bal)-OH werden in eine auf -30 °C gekühlte Mischung von 1000 ml 1N NaOH/Ethanol (1:1) eingetragen. Zu dieser Lösung läßt man gleichzeitig 150 ml (1 Mol) auf -20 °C vorgekühltes Z-Cl sowie eine ebenfalls auf -20 °C vorgekühlte Mischung von 1250 ml 1N NaOH/990 ml Ethanol zutropfen. Man läßt die Reaktionslösung auf -5 °C kommen und fügt bei dieser Temperatur 125 ml (1.5 Mol) einer auf 3 °C gekühlten konz. HCl-Lösung hinzu. Nun wird so lange bei 50 °C gerührt, bis sich alles gelöst hat. Die klare Lösung wird auf 1.5 l eingeengt und dreimal ausgeethert. Die Wasserphase wird mittels 2N NaOH auf pH 6.2 gebracht und eventuell entstandenes N^{ϵ}-Z-Lysin abfiltriert. Aus der klaren Lösung kristallisiert N^{α}-Z-L-Lysin innerhalb 36 h in der Kälte aus. Das Produkt wird aus Wasser umkristallisiert. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Ausbeute: 122.7 g (85.4% d. Th.)
Fp.: 226 °C, Lit. 226-228 °C[277)]

$[\alpha]_D^{23}$: - 10.0° ± 0.5° (c=1, 0.2N HCl)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{26}$: - 12.0° ± 0.1° (c=2, 0.2N HCl)

$C_{14}H_{20}N_2O_4$ (280.33) Ber.: C 59.98 H 7.19 N 10.00
Gef.: C 59.93 H 7.28 N 10.22

V. 5. 6. 3. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin·Dicyclohexylammonium (Z-L-Lys(Boc)-OH·DCHA)

140.0 g (500 mMol) N^{α}-Z-L-Lys-OH werden in 500 ml Dioxan und 250 ml 2N NaOH gelöst, mit 2.5 g MgO und 80.0 g (550 mMol) Boc-N_3 versetzt und 24 h bei 45 °C gerührt. Danach wird etwas eingeengt, mit EE überschichtet und mit Citronensäure auf pH 3 angesäuert. Die EE-Phase wird abgetrennt, mit wenig Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration wird eingeengt, in Ether aufgenommen und mittels Dicyclohexylamin in das entsprechende Salz überführt. Der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und aus Ethanol/Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 256.7 g (91.4% d. Th.)
Fp.: 153 °C, Lit. 150-153 °C[278)]

$[\alpha]_D^{23.5}$: + 6.9° ± 0.5° (c=1, EtOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: + 7.82° (c=1, EtOH)

$C_{31}H_{51}N_3O_6$ (561.76) Ber.: C 66.28 H 9.15 N 7.48
Gef.: C 66.03 H 9.14 N 7.49

V. 5. 7. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

700 mg (1.8 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OH (freigesetzt mit Citronensäure aus dem DCHA-Salz), 1.1 g (1.8 mMol) H-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, 250 mg (1.8 mMol) HOBt und 0.7 ml (6 mMol) N-Methylmorpholin werden in 50 ml DMF gelöst und auf -12 °C gekühlt. Nach 15 Minuten fügt man 410 mg (2 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem DMF, hinzu, rührt 2 h in der Kälte und läßt dann langsam auf RT kommen. Nach 36 h wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff in der Kälte abfiltriert und das Filtrat im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, Ungelöstes abfiltriert, mit 20%iger Citronensäurelösung (3x), mit Wasser (1x), mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung (2x) und mit Wasser (2x) gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird das Filtrat eingeengt, mit Ether versetzt und das Tetrapeptid mit Hexan gefällt. Umkristallisation erfolgt aus EE/Hexan. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Ausbeute: 1.3 g (78% d. Th.)
Fp.: 147-149 °C

$[\alpha]_D^{22}$: - 17° ± 0.5° (c = 0.7, DMF)

$C_{49}H_{75}N_5O_{12}$ (926.16) Ber.: C 63.55 H 8.16 N 7.56
Gef.: C 63.40 H 8.08 N 7.22

V. 5. 7. 1. N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(ß-tert.-butyl)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (H-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

926 mg (1 mMol) des vorstehenden Tetrapeptids werden in Methanol und wenig Wasser gelöst, mit 100 mg Pd(10%)/C versetzt und 6 h im Durchflußverfahren bei pH 4.5 (Zugabe methanolischer HCl mittels Autotitrator) hydriert. Danach wird vom Katalysator befreit und mehrmals mit Methanol einrotiert. Der zurückbleibende weiße Rückstand wird 24 h über KOH im Hochvakuum getrocknet. Einheitlich in System D.

Ausbeute: 734 mg (89% d. Th.)

$C_{41}H_{70}ClN_5O_{10}$ (828.49) Ber.: C 59.44 H 8.52 Cl 4.28 N 8.45
Gef.: C 58.78 H 8.78 Cl 4.70 N 8.28

V. 5. 8. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginin·Dicyclohexylammonium (N^{α}-Z-L-Arg(Mbs)-OH·DCHA)

V. 5. 8. 1. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-L-arginin (N^{α}-Z-L-Arg-OH)

N^{α}-Z-L-Arg-OH wird nach Bergmann et al[273] mit 69% Ausbeute synthetisiert. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Fp.: 175 °C, Lit. 175 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 9.0° ± 0.5° (c=1.8, 1N HCl)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{23}$: - 9.3° ± 0.5° (c=2, 1N HCl)

$C_{14}H_{20}N_4O_4$ (308.33) Ber.: C 54.54 H 6.54 N 18.17
Gef.: C 54.35 H 6.57 N 17.74

V. 5. 8. 2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginin·Dicyclohexylammonium (N^{α}-Z-L-Arg(Mbs)-OH·DCHA)

Die Verbindung wird nach Nishimura et al[237] in 76%iger Ausbeute dargestellt. Einheitlich in den Systemen A und D.

Fp.: 110 °C, Lit. 110-112 °C

$[\alpha]_D^{21}$: + 2.5° ± 0.2° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{23}$: + 5.1° (c=1.35, MeOH)

$C_{33}H_{49}N_5O_7S$ (659.79) Ber.: C 60.07 H 7.49 N 10.63 S 4.86
Gef.: C 59.58 H 7.53 N 10.91 S 4.87

V. 5. 9. N$^{\alpha}$-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginyl-N$^{\epsilon}$-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (N$^{\alpha}$-Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

350 mg (0.7 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-OH (freigesetzt mit Citronensäure aus Z-L-Arg(Mbs)-OH·DCHA), 600 mg (0.72 mMol) H-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, 101 mg (0.75 mMol) HOBt und 0.2 ml (2 mMol) N-Methylmorpholin werden in 100 ml DMF gelöst und auf -8 °C gekühlt. Nach 5 Minuten fügt man 145 mg (0.8 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem DMF, hinzu, läßt 2 h in der Kälte und 48 h bei RT reagieren. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert, das Filtrat im Hochvakuum eingeengt und der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen. Nachdem von Ungelöstem abfiltriert wurde, wird mit 20%iger Citronensäurelösung (3x), mit Wasser (1x), mit 10%iger $NaHCO_3$-Lösung (4x) und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird etwas eingeengt, mit Ether versetzt und mit Hexan gefällt. Das geschützte Pentapeptid wird aus DMF/Wasser umkristallisiert. Einheitlich in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 570 mg (63% d. Th.)
Fp.: 164-165 °C

$C_{62}H_{93}N_9O_{16}S$ (1252.50) Ber.: C 59.46 H 7.48 N 10.06
Gef.: C 59.01 H 7.63 N 10.23

V. 6. Synthese des geschützten Thymopoietin (32-36) nach Syntheseweg 2, (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 6. 1. Benzyloxycarbonyl-L-valin-hydroxysuccinimidester (Z-L-Val-OSu)

Der Aktivester wird mit 78% Ausbeute nach Zitat[280] dargestellt. Chromatographisch rein in System D.

Fp.: 115-116 °C, Lit. 116-117 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 22.8° ± 0.5° (c=1.9, Dioxan)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 25.1° (c=2, Dioxan)

$C_{17}H_{20}N_2O_6$ (348.56) Ber.: C 58.61 H 5.79 N 8.04
Gef.: C 58.43 H 5.68 N 8.13

V. 6. 2. Benzyloxycarbonyl-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

3.3 g (10 mMol) H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl werden in 200 ml CH_2Cl_2/DMF (4:1) gelöst, mit 1.2 ml (11 mMol) N-Methylmorpholin versetzt und auf 5 °C gekühlt. Zu dieser Lösung läßt man 3.5 g (10 mMol) Z-L-Val-OSu, gelöst in CH_2Cl_2, zutropfen. Nach 12 h Reaktionszeit bei RT wird zur Trockene eingeengt, in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäure (3x), mit Wasser (1x), mit 10%iger $NaHCO_3$-Lösung (2x) und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Die EE-Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Es verbleibt ein hellgelbes Oel, welches in den Systemen A und D einheitlich ist.

Ausbeute: 4.9 g (92.5% d. Th.)

Fp.: Oel

$[\alpha]_D^{21}$: + 15.9° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{30}H_{42}N_2O_6$ (526.67) Ber.: C 68.42 H 8.04 N 5.32
Gef.: C 68.09 H 7.91 N 5.41

V. 6. 2. 1. L-Valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

4.5 g (8.5 mMol) Z-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden analog Vorschrift V.5.3.1. entacyliert. Einheitlich in System D.

Ausbeute: 3.5 g (95.4% d. Th.)
Fp.: 210-213 °C (amorphes Pulver)

$[\alpha]_D^{21}$: + 39.8° ± 0.5° (c=0.4, DMF)

$C_{22}H_{37}ClN_2O_4$ (429.00) Ber.: C 61.60 H 8.69 Cl 8.26 N 6.53
Gef.: C 60.91 H 8.87 Cl 8.93 N 6.19

V. 6. 3. Benzyloxycarbonyl-L-asparaginsäure(ß-tert.-butylester)-hydroxysuccinimidester (Z-L-Asp(ß-OBu^t)-OSu)

Der Aktivester wird nach Wünsch et al[281] mit 78% Ausbeute synthetisiert. Chromatographisch rein in System A.

Fp.: 150-151 °C, Lit. 151.5-152.5 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 19.4° ± 0.5° (c=1.1, Dioxan)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 27.4° (c=1.1, DMF)

$C_{20}H_{24}N_2O_8$ (420.42) Ber.: C 57.17 H 5.75 N 6.66
Gef.: C 57.22 H 5.90 N 6.59

V. 6. 4. Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

3.4 g (7.9 mMol) H-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl werden in 50 ml DMF gelöst, mit 1 ml (8.8 mMol) N-Methylmorpholin und nach 10 Minuten mit 3.4 g (8 mMol) Z-L-Asp(ß-OBu^t)-OSu versetzt. Nach 24 h wird die Reaktionslösung eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen und wie in Vorschrift V.5.5. aufgearbeitet. Einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 5.0 g (90% d. Th.)
Fp.: 153-154 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 6.8° ± 0.5° (c=0.9, DMF)

$C_{38}H_{55}N_3O_9$ (697.87) Ber.: 65.40 H 7.94 N 6.02
Gef.: 65.27 H 8.14 N 6.08

V. 6. 4. 1. L-Asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

5.0 g (7.2 mMol) Z-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden wie unter V.5.5.1. beschrieben hydriert. Einheitlich in System D.

Ausbeute: 4.0 g (92% d. Th.)
Fp.: 125 °C (Zers.)

$C_{30}H_{50}ClN_3O_7$ (600.20) Ber.: C 60.03 H 8.40 Cl 5.91 N 7.00
Gef.: C 59.74 H 7.98 Cl 5.89 N 6.62

V. 6. 5. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin-hydroxysuccinimidester (Z-L-Lys(Boc)-OSu)

Die Verbindung wird nach Zitat[282)] in 86%iger Ausbeute hergestellt. Chromatographisch rein in System D.

Fp.: 96-97 °C, Lit. 96-98 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 17.1° ± 0.5° (c=3.5, Dioxan)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: - 15.9° (c=3.5, Dioxan)

$C_{23}H_{31}N_3O_8$ (477.51) Ber.: C 57.85 H 6.54 N 8.80
Gef.: C 57.78 H 6.51 N 8.92

V. 6. 6. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

3.0 g (5 mMol) H-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl werden in 40 ml DMF gelöst und mit 0.5 ml (5.4 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach 10 Minuten tropft man 2.6 g (5.5 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OSu, gelöst in wenig DMF, in die Reaktionslösung. Nach 6 h gibt man weitere 0.6 ml (5.6 mMol) N-Methylmorpholin hinzu und läßt noch 18 h weiterreagieren. Anschließend wird eingeengt, in EE aufgenommen und wie unter V.5.7. beschrieben aufgearbeitet.

Ausbeute: 3.8 g (82.6% d. Th.)
Fp.: 149-150 °C

$[\alpha]_D^{25}$: - 13.7° ± 0.5° (c=0.5, CH_2Cl_2)

$C_{49}H_{75}N_5O_{12}$ (926.16) Ber.: C 63.55 H 8.16 N 7.56
Gef.: C 63.40 H 8.08 N 7.22

V. 6. 6. 1. N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl-(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl)

Die Verbindung wird analog Vorschrift V.5.7.1. synthetisiert. Einheitlich in System und System H.

Ansatz: 1.85 g (2 mMol) Z-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t
Ausbeute: 1.5 g (91% d. Th.)

$C_{41}H_{70}ClN_5O_{10}$ (828.49) Ber.: C 59.44 H 8.52 Cl 4.28 N 8.45
Gef.: C 58.75 H 8.37 Cl 4.83 N 8.09

V. 6. 7. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginin-hydroxysuccinimidester (Z-L-Arg(Mbs)-OSu)

21.0 g (44 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-OH (freigesetzt aus Z-L-Arg(Mbs)-OH·DCHA mittels Citronensäure) und 5.1 g (44.3 mMol) HOSu werden in 250 ml Ethylenglykoldimethylether gelöst und auf -25 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man 9.2 g (44.5 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem Ethylenglykoldimethylether, hinzu. Es wird 2 h in der Kälte und 24 h bei RT gerührt. Das Filtrat der vom entstandenen Dicyclohexylharnstoff befreiten Lösung wird zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in CH_2Cl_2 gelöst und der Aktivester mit Petrolether (30-50 °C) gefällt. Umkristallisiert wird aus Isopropanol. Die Verbindung ist chromatographisch rein in System D.

Ausbeute: 15.7 g (60.9% d. Th.)
Fp.: 157-160 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 16.8° ± 0.5° (c=1.43, DMF)

$C_{25}H_{29}N_5O_9S$ (575.56) Ber.: C 52.16 H 5.08 N 12.17 S 5.56
Gef.: C 51.13 H 5.36 N 12.02 S 5.57

V. 6. 8. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

82.8 mg (0.1 mMol) Tetrapeptid (von V.6.6.1.) und 2 Tropfen N-Methylmorpholin werden in 20 ml DMF gelöst. Nach 15 Minuten versetzt man die Lösung mit 63.0 mg (0.11 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-OSu und läßt 28 h rühren. Nachdem das DMF im Hochvakuum entfernt wurde, wird wie unter V.5.9. beschrieben aufgearbeitet. Einheitlich in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 125 mg (91% d. Th.)
Fp.: 164-165 °C

$C_{62}H_{93}N_9O_{16}S$ (1252.50) Ber.: C 59.46 H 7.48 N 10.06
Gef.: C 59.05 H 7.63 N 10.35

V. 7. Synthese des geschützten Thymopoietin (32-36) nach Syntheseweg 3, (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 7. 1. N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysin (H-L-Lys(Boc)-OH)

Methode 1: H-L-Lys(Boc)-OH wird nach der Vorschrift von Schwyzer et al [283] mit 38% Ausbeute synthetisiert. Sowohl in System A als auch D sind noch Spuren von L-Lysin zu finden.

Fp.: 260-264 °C, Lit. 237-255 °C

$[\alpha]_D^{24}$: + 4.9° ± 0.5° (c=1.02, 2N NH_3)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{26}$: + 4.7° (c=0.8, 2N NH_3)

$C_{11}H_{22}N_2O_4$ (246.31) Ber.: C 53.64 H 9.00 N 11.37
Gef.: C 52.71 H 8.96 N 11.45

Methode 2: 40 g (105 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OH werden in 640 ml MeOH und 100 ml Wasser gelöst, mit 4.2 g Pd(10%)/C versetzt und 18 h im Durchflußverfahren hydriert. Das ausgefallene H-L-Lys(Boc)-OH wird durch Zugabe von 1000 ml Wasser in Lösung gebracht. Nach Entfernen des Katalysators wird eingeengt, wobei das Produkt ausfällt. Einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 23.8 g (92% d. Th.)
Fp.: 255-256 °C

$[\alpha]_D^{25}$: + 5.1° ± 0.5° (c=1, 2N NH_3)

$C_{11}H_{22}N_2O_4$ (246.31) Ber.: C 53.64 H 9.00 N 11.37
Gef.: C 53.38 H 9.04 N 11.24

V. 7. 2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-OH)

493 mg (2 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH und 230 mg (2 mMol) Na_2CO_3 werden in 50 ml DMF/Wasser (1:9) gelöst und mit einer Lösung von 1060 mg (2 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-OSu in 10 ml DMF versetzt.

Nach 8 h wird das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in CH_2Cl_2 aufgenommen, mit 2N Citronensäure und mehrmals mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird aus CH_2Cl_2/EE/Ether kristallisiert. Einheitlich in System A und System D.

Ausbeute: 880 mg (63% d. Th.)
Fp.: 170-171 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 5.7° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{32}H_{46}N_6O_{10}S$ (706.75) Ber.: C 54.38 H 6.56 N 11.89
Gef.: C 55.55 H 6.61 N 12.23

V. 7. 3. <u>N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginin-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)</u>

Eine Lösung von 706 mg (1 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-OH und 660 mg (1.1 mMol) H-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl sowie 135 mg (1 mMol) HOBt und 0.2 ml (2 mMol) N-Methylmorpholin in 50 ml DMF kühlt man auf -20 °C. Dazu gibt man 230 mg (1.1 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem DMF. Man läßt langsam auf RT kommen und rührt anschließend noch 48 h. Nach Absaugen des Dicyclohexylharnstoffs in der Kälte engt man das Filtrat ein, nimmt in EE auf und arbeitet wie unter V.5.9. beschrieben auf.

Ausbeute: 400 mg (32% d. Th.)
Fp.: 159-164 °C
$[\alpha]_D^{21}$: + 7.75° ± 0.5° (c=0.2, DMF)

$C_{62}H_{93}N_9O_{16}S$ (1252.50) Ber.: C 59.46 H 7.48 N 10.06
Gef.: C 57.21 H 6.98 N 11.03

V. 8. Synthese des geschützten Thymopoietin (32-36) nach Syntheseweg 4, (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 8. 1. α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Ddz-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 8. 1. 1. α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl-L-valin·Dicyclohexylammonium (Ddz-L-Val-OH·DCHA)

11.7 g (0.1 Mol) L-Valin werden in 45 ml Benzyltrimethylammoniumhydroxydlösung (Triton B, 40% in Methanol) gelöst (10 h, 40 °C). Danach wird dreimal azeotrop mit je 100 ml DMF am Rotationsverdampfer eingeengt. Der wasserfreie Rückstand wird unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß in 150 ml absolutem Pyridin gelöst. Anschließend werden 29.2 g (0.11 Mol) Ddz-N_3, gelöst in 100 ml Pyridin, zugetropft. Das Reaktionsgemisch wird bei 40 °C ca. 60 h gerührt. Nach Einengen im Vakuum wird in 200 ml 1N NaOH aufgenommen und insgesamt viermal mit Ether extrahiert. Die Wasserphase wird nach Ansäuern mit 50%iger Citronensäure auf pH 4 mit CH_2Cl_2 extrahiert (2x). Die gesammelten Extrakte werden mit Wasser (3x) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Da Ddz-L-Val-OH nicht kristallisiert, wird die Verbindung in das Dicyclohexylammoniumsalz überführt. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Ausbeute: 32.7 g (62.9% d. Th.)
Fp.: 114 °C

$C_{29}H_{48}N_2O_6$ (520.71) Ber.: C 66.89 H 9.30 N 5.38
Gef.: C 66.74 H 9.87 N 5.49

V. 8. 1. 2. α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl-L-valin-hydroxysuccinimidester (Ddz-L-Val-OSu)

10.2 g (30 mMol) Ddz-L-Val-OH (freigesetzt mit Citronensäure aus Ddz-L-Val-OH·DCHA) werden in 250 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 3.55 g (30 mMol) HOSu versetzt. Die Reaktionslösung wird auf -30 °C gekühlt und mit 6.9 g (33 mMol) DCCI, gelöst in wenig

CH_2Cl_2, versetzt. Man läßt langsam auf RT kommen und rührt anschließend noch 20 h. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert, das Filtrat eingeengt und der Aktivester aus warmen Isopropanol kristallisiert.

Ausbeute: 10.35 g (79% d. Th.)
Fp.: 134-136 °C

$C_{21}H_{28}N_2O_8$ (436.46) Ber.: C 57.79 H 6.47 N 6.42
Gef.: C 58.16 H 6.73 N 6.52

V. 8. 1. 3. <u>α,α-Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Ddz-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)</u>

<u>Methode 1</u>: 1.7 g (5 mMol) Ddz-L-Val-OH, 1.65 g (5 mMol) H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, 675 mg (5 mMol) HOBt und 1.1 ml (10 mMol) N-Methylmorpholin werden in 30 ml DMF/CH_2Cl_2 (3:1) gelöst und auf -20 °C gekühlt. Zu dieser Reaktionsmischung fügt man 1.15 g (5.6 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem DMF, hinzu. Nach 18 h Rühren bei RT wird in der Kälte der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat eingeengt, in EE aufgenommen und nacheinander mit 20%iger Citronensäure (4x), H_2O (1x), 5%iger $NaHCO_3$-Lösung (3x) und Wasser (3x) gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird zur Trockene eingeengt. Es verbleibt ein weißes, amorphes Pulver, welches in den Systemen A, D und H einheitlich ist.

<u>Methode 2</u>: 1.65 g (5 mMol) H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl werden in 25 ml DMF gelöst und mit 1.1 ml (10 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach 10 Minuten gibt man zu der Reaktionslösung 2.2 g (5 mMol) Ddz-L-Val-OSu und läßt 24 h bei RT rühren. Danach wird eingeengt, in EE aufgenommen und wie bei Methode 1 aufgearbeitet.

Ausbeute: Methode 1: 2.20 g (73.4% d. Th.)
Methode 2: 2.53 g (85.3% d. Th.)
Fp.: Methode 1: 96 °C (amorphes Pulver)
Methode 2: Oel
Racemattest: Methode 1: 0.4% D-Val, 0.9% D-Tyr
Methode 2: 0.1% D-Val, 0.6% D-Tyr

$C_{34}H_{50}N_2O_8$ (614.78) Ber.: C 66.43 H 8.20 N 4.56
Methode 1 Gef.: C 66.59 H 7.97 N 4.89
Methode 2 Gef.: C 66.31 H 8.03 N 4.73

V. 8. 2. L-Valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Trifluoracetat (H-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA)

2.4 g (3.9 mMol) Ddz-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden eine Stunde in 50 ml 3% TFA/CH_2Cl_2 (v/v) gerührt. Danach wird die Reaktionslösung mit 15 ml Benzol versetzt und zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in Methanol aufgenommen und wiederum eingeengt. Diesen Vorgang wiederholt man zweimal. Aus Methanol/Ether/Hexan kristallisiert die Verbindung aus. Chromatographisch einheitlich in System D.

Ausbeute: 1.9 g (95.6% d. Th.)
Fp.: 203 °C
$[\alpha]_D^{21}$: + 40° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{24}H_{37}F_3N_2O_6$ (506.56) Ber.: C 56.91 H 7.36 N 5.53
Gef.: C 57.04 H 7.57 N 5.86

V. 8. 3. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Adpoc-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 8. 3. 1. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-valin (Adpoc-L-Val-OH)

11.8 g (100 mMol) werden unter gelindem Erwärmen (40 °C) in 60 ml einer ca. 40%igen Lösung von Benzyltrimethylammoniumhydroxyd in Methanol gelöst. Um letzte Spuren Wasser zu entfernen, wird zweimal in DMF aufgenommen und eingeengt. Der Rückstand wird in DMF aufgenommen und auf 0 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung werden 26.0 g (110 mMol) Adpoc-F und 16 ml Triethylamin gegeben. Man läßt langsam auf RT erwärmen und rührt noch 12 h. Danach wird auf Eiswasser gegossen und mit 1N Citronensäure angesäuert. Nach mehrfacher Extraktion mit EE

werden die EE-Phasen mit Wasser neutral gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einengen wird mit Ether versetzt und bis zur beginnenden Trübung Hexan zugegeben. Einheitlich in System A und D.

Ausbeute: 31.4 g (92.5% d. Th.)
Fp.: 150 °C
$[\alpha]_D^{27}$: - 3.2° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$C_{19}H_{31}NO_4$ (337.46) Ber.: C 67.63 H 9.26 N 4.15
Gef.: C 67.64 H 9.27 N 4.14

V. 8. 3. 2. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-valin-hydroxysuccinimidester (Adpoc-L-Val-OSu)

10.4 g (30.9 Mmol) Adpoc-L-Val-OH werden in 60 ml Ethylenglykoldimethylether gelöst und mit 3.56 g (30.9 mMol) HOSu versetzt. Nach Abkühlen auf -30 °C fügt man 7.0 g (34 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem Ethylenglykoldimethylether, hinzu. Man beläßt noch 2 h bei -30 °C und rührt danach noch 18 h bei RT. Dann wird in der Kälte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, vollständig eingeengt, in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit Hexan gefällt. Der Aktivester wird aus Isopropanol umkristallisiert und verhält sich in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 9.7 g (72% d. Th.)
Fp.: 128-129 °C
$[\alpha]_D^{27}$: - 27° ± 0.5° (c=1.03, MeOH)

$C_{23}H_{34}N_2O_6$ (434.53) Ber.: C 63.58 H 7.89 N 6.45
Gef.: C 63.36 H 7.96 N 6.37

V. 8. 3. 3. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Adpoc-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

Methode 1: Es werden 3.1 g (9.1 mMol) Adpoc-L-Val-OH, 3.0 g (9.1 mMol) H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl und 1.2 g (9.1 mMol) HOBt in 40 ml DMF gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Zu dieser Reak-

tionslösung werden 1 ml (9.1 mMol) N-Methylmorpholin und 2.0 g (9.8 mMol) DCCI hinzugefügt. Die Reaktionslösung läßt man auf RT erwärmen und danach noch 24 h reagieren. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert, die Lösung eingeengt, in EE aufgenommen, mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung, Wasser, 20%iger Citronensäurelösung und mit Wasser gewaschen. Die EE-Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet, etwas eingeengt und mit Petrolether (30-50 °C) versetzt. Die Verbindung ist chromatographisch einheitlich in den Systemen A, D und H.

Methode 2: 3.0 g (9.1 mMol) H-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl werden in 15 ml DMF gelöst und mit 1 ml (9.1 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach 10 Minuten fügt man 3.95 g (9.1 mMol) Adpoc-L-Val-OSu hinzu und läßt 20 h reagieren. Nach Einengen und Aufnehmen in EE wird wie bei Methode 1 aufgearbeitet. Einheitlich in System D.

Ausbeuten: Methode 1: 4.2 g (77% d. Th.)
Methode 2: 4.15 g (75% d. Th.)

Fp.: Methode 1: 106 °C
Methode 2: 104-105 °C

$[\alpha]_D^{25}$: Methode 1: + 1.3° ± 0.5° (c=0.82, DMF)
Methode 2: + 1.1° ± 0.5° (c=1.04, DMF)

Racemattest: Methode 1: 0.2% D-Val, 0.9% D-Tyr
Methode 2: 0.4% D-Val, 0.4% D-Tyr

$C_{36}H_{56}N_2O_6$ (612.87) Ber.: C 70.55 H 9.21 N 4.57
Methode 1: Gef.: C 70.16 H 9.20 N 4.86
Methode 2: Gef.: C 70.00 H 9.39 N 4.72

V. 8. 4. L-Valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Trifluoracetat (H-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA)

7.0 g (11 mMol) Adpoc-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden bei 0 °C mit 70 ml einer 3%igen (v/v)-Lösung von TFA in CH_2Cl_2 übergossen und 30 Minuten gerührt. Es werden 140 ml Benzol hinzugefügt, und danach wird das Reaktionsgemisch eingedampft. Der Rückstand wird in MeOH aufgenommen und wiederum eingeengt.

Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Der Rückstand wird in MeOH aufgenommen und mit Ether versetzt. Das TFA-Salz kristallisiert innerhalb ca. 15 h aus. Chromatographisch rein in System D.

Ausbeute: 5.5 g (96.1% d. Th.)
Fp.: 202-204 °C
$[\alpha]_D^{22}$: + 38.3° ± 0.5° (c=0.78, DMF)
$C_{24}H_{37}F_3N_2O_6$ (506.56) Ber.: C 56.91 H 7.36 N 5.53
Gef.: C 56.76 H 7.44 N 5.60

V. 8. 5. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-asparagyl-(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

V. 8. 5. 1. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin (Adpoc-L-Lys(Boc)-OH)

Methode 1: 4.93 g (20 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH werden in 15 ml einer ca. 40%igen Lösung von Benzyltrimethylammonium-hydroxid gelöst. Nachdem sich alles gelöst hat (leichte Grünfärbung) wird eingeengt und mehrmals mit DMF am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wird in 30 ml DMF gelöst, auf -20 °C abgekühlt und mit 6.0 g (25 mMol) Adpoc-F und 3.5 ml (25 mMol) Triethylamin versetzt. Nach 24 h wird die Reaktionslösung in Eiswasser gegossen und mit 10%iger Citronensäure angesäuert. Es wird mit EE extrahiert und die EE-Phasen neutral gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wird eingeengt, bis ein farbloses Oel zurückbleibt. Einheitlich in System A und D.

Methode 2: Zu 4.93 g (20 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH und 3.5 ml (25 mMol) Triethylamin in 60 ml Dioxan/Wasser werden 9.2 g (25 mMol) Adpoc-ON gegeben. Nach 1.5 h wird die Reaktionsklar. Man läßt noch 2.5 h reagieren. Danach verteilt man zwischen Hexan und Wasser. Die wäßrige Phase wird mit Citronen-

säure angesäuert und mit Ether extrahiert. Die Etherphasen werden neutral gewaschen und mit Na_2SO_4 getrocknet. Nach Einengen verbleibt ein farbloses Oel, welches in System D einheitlich ist.

Methode 3: 9.0 g (36.54 mMol) H-L-Lys(Boc)-OH werden in 60 ml Dioxan suspendiert und auf +5 °C abgekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur gibt man 55 ml (55 mMol) 1N NaOH-Lösung hinzu. Sobald die Reaktionsmischung klar wird, fügt man 3.4 g (40.0 mMol) festes $NaHCO_3$ hinzu. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C tropft man 9.6 g (40.0 mMol) Adpoc-F, gelöst in Ether, innerhalb 1 h hinzu. Man läßt langsam auf RT erwärmen und gibt nach 1 h 5.6 ml (40.0 mMol) Triethylamin zu. Nach 18 h wird die Reaktionslösung mit Ether extrahiert, die Etherphase dreimal mit Wasser zurückgewaschen, die vereinigten Wasserphasen mit Citronensäure auf pH 3.5 angesäuert und mit EE (3x) extrahiert. Nach Neutralwaschen und Trocknen mit Na_2SO_4 wird eingeengt. Zurück bleibt ein weißes amorphes Pulver. Chromatographisch rein in System A und System D.

Ausbeuten: Methode 1: 7.9 g (84% d. Th.)
Methode 2: 8.9 g (95.7% d. Th.)
Methode 3: 14.9 g (87.2% d. Th.)

Fp.: Methode 1: Oel
Methode 2: Oel
Methode 3: 71-75 °C (amorphes Pulver)

$[\alpha]_D^{21}$: Methode 1: - 2.7° ± 0.5° (c=1.23, EtOH)
Methode 2: - 3.6° ± 0.5° (c=1, MeOH)
Methode 3: - 2.8° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$C_{25}H_{42}N_2O_6$ (466.62) Ber.: C 64.35 H 9.07 N 6.00
Methode 1: Gef.: C 64.60 H 9.16 N 6.20
Methode 2: Gef.: C 64.69 H 8.76 N 6.39
Methode 3: Gef.: C 64.01 H 9.39 N 5.87

V. 8. 5. 2. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysin-hydroxysuccinimidester (Adpoc-L-Lys(Boc)-OSu)

9.33 g (20.0 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-OH werden in 50 ml Ethylenglykoldimethylether gelöst. Nach Zugabe von 2.3 g (20.0 mMol) HOSu wird auf -25 °C abgekühlt und nach 15 Minuten mit 4.54 g (22.0 mMol) DCCI versetzt. Man beläßt 2 h bei -25 °C und läßt anschließend noch 24 h bei RT reagieren. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird in der Kälte abfiltriert. Die eingeengte Lösung wird in EE aufgenommen und mit Petrolether versetzt. Umkristallisiert wird aus Isopropanol. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 8.7 g (77.3% d. Th.)
Fp.: 118-120 °C (Sint.), 160 °C (Zers.)
$[\alpha]_D^{21}$: - 21.4° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$C_{29}H_{45}N_3O_8$ (563.70) Ber.: C 61.79 H 8.05 N 7.45
Gef.: C 61.65 H 8.03 N 7.46

V. 8. 5. 3. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl-(ß-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

Methode 1: 1.5 g (2.5 mMol) H-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, 1.17 g (2.5 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-OH, 0.35 g (2.5 mMol) HOBt und 2 ml N-Methylmorpholin werden in 30 ml DMF gelöst. Die Reaktionslösung wird auf -5 °C abgekühlt und mit 580 mg (2.75 mMol) DCCI versetzt. Nach 36 h wird in der Kälte vom Dicyclohexylharnstoff befreit und eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, mit 10%iger Citronensäure (2x), mit Wasser (1x), mit 10%iger $NaHCO_3$-Lösung (3x) und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wird eingeengt und aus Ether/Hexan kristallisiert. Chromatographisch rein in System A, D und H.

Methode 2: 1.5 g (2.5 mMol) H-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·HCl, 2 ml N-Methylmorpholin und 1.41 g (2.5 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-OSu werden 36 h in 40 ml DMF umgesetzt. Nach Einengen und Aufnahme des Rückstandes in EE wird wie bei Methode 1 weitergearbeitet.

Ausbeuten: Methode 1: 2.0 g (79.1% d. Th.)
Methode 2: 2.24 g (88.3% d. Th.)
Fp.: Methode 1: 122-124 °C (Sint.), 159 °C (Zers.)
Methode 2: 124 °C (Sint.), 159-161 °C (Zers.)

Racemattest:	D-Lys	D-Asp	D-Val	D-Tyr
Methode 1:	3.4%	13.5%	1.6%	4.3%
Methode 2:	0.9%	5.2%	0.7%	1.7%

$C_{55}H_{89}N_5O_{12}$ (1012.35) Ber.: C 65.25 H 8.86 N 6.93
Methode 1: Gef.: C 65.08 H 9.00 N 6.71
Methode 2: Gef.: C 64.94 H 8.76 N 6.95

V. 8. 6. N$^\epsilon$-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl-(ß-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Trifluoracetat (H-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA)

2.0 g (2.0 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-(Bu^t)-OBu^t) werden in 20 ml einer 3%igen (v/v)-Lösung von TFA in CH_2Cl_2 bei 0 °C eingetragen. Nach 1 h wird mit 40 ml Benzol versetzt und vollständig eingedampft. Der Rückstand wird in wenig MeOH aufgenommen und mit Ether/Petrolether versetzt. Die Verbindung kristallisiert als weiße Nadeln aus und ist einheitlich in System D.

Ausbeute: 1.2 g (67% d. Th.)
Fp.: 132 °C (Zers.)

$C_{43}H_{70}F_3N_5O_{12}$ (906.00) Ber.: C 57.00 H 7.79 N 7.73
Gef.: C 56.64 H 7.58 N 7.63

V. 8. 7. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{G}-p-methoxybenzosulfonyl-L-arginyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-O-tert.-butyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

470 mg (1 mMol) Z-L-Arg(Mbs)-OH und 100 mg (1.1 mMol) Pyridon werden in 30 ml absolutem Pyridin gelöst. Nach Abkühlen auf -5 °C werden 230 mg (1.1 mMol) DCCI hinzugefügt. Nach 12 h Rühren bei 0 °C wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Reaktionslösung vorsichtig eingeengt. Der Rückstand wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit Eiswasser (1x), mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung (1x) und wiederum mit Wasser (2x) gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wird auf ein kleines Volumen eingeengt. Diese Aktivesterlösung wird zu einer Lösung von 660 mg (0.8 mMol) H-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t·TFA und 0.5 ml N-Methylmorpholin in 30 ml CH_2Cl_2/DMF (4:1) zugetropft. Nach 18 h Rühren wird eingeengt, der Rückstand in $CHCl_3$ aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit Wasser (1x), mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird eingeengt und das Pentapeptid mit Ether/Hexan gefällt. Einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 890 mg (89% d. Th.)

Fp.: 164.5-165 °C

$[\alpha]_D^{22}$: + 8.7° ± 0.5° (c=0.1, DMF)

Racemattest: 1.9% D-Arg, 1.6% D-Lys, 6.0% D-Asp, 1.5% D-Val, 4.8% D-Tyr.

$C_{62}H_{93}N_9O_{16}S$ (1252.50) Ber.: C 59.46 H 7.48 N 10.06
Gef.: C 59.32 H 7.19 N 9.95

V. 9. Synthese des geschützten Thymopoietin (32-36) nach Syntheseweg 5, (Z-L-Arg(Z_2)-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t)

V. 9. 1. Benzyloxycarbonyl-L-valyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Val-L-Tyr-OBu^t)

4.1 g (17.3 mMol) H-L-Tyr-OBu^t, 4.34 g (17.3 mMol) Z-L-Val-OH und 2.34 g (17.3 mMol) HOBt werden in 50 ml DMF/CH_2Cl_2 (1:1) gelöst. Nach Abkühlen auf -10 °C wird die Reaktionslösung mit 4.0 g (19.0 mMol) DCCI, gelöst in wenig kaltem DMF, versetzt. Nach 12 h wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff befreit und eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und nacheinander mit 20%iger Citronensäure (2x), Wasser (1x), mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung (4x) und mit Wasser gewaschen. Kristallisation erfolgt aus EE/Ether/Petrolether. Chromatographisch rein in System A und System D.

Ausbeute: 7.3 g (89.8% d. Th.)
Fp.: 56-58 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 20.5° ± 0.5° (c=2, MeOH)

$C_{26}H_{34}N_2O_6$ (470.57) Ber.: C 66.36 H 7.28 N 5.95
Gef.: C 66.35 H 7.39 N 6.42

V. 9. 1. 1. L-Valyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Val-L-Tyr-OBu^t·HCl)

7.0 g (14.9 mMol) Z-L-Val-L-Tyr-OBu^t werden in 100 ml MeOH gelöst und mit 1.0 g Pd(10%)/C-Katalysator versetzt. Es wird 2 h im Durchflußverfahren bei einem pH von 5.0 (Zugabe methanolischer HCl mittels Autotitrator) entacyliert. Nach Entfernen des Katalysators wird mehrmals mit Methanol eingeengt. Die Verbindung kristallisiert aus Methanol/Ether. Einheitlich in System D.

Ausbeute: 5.2 g (94.6% d. Th.)
Fp.: 167-170 °C

$[\alpha]_D^{20}$: + 4.9° ± 0.5° (c=1.5, MeOH)

$C_{18}H_{29}ClN_2O_4$ (372.89) Ber.: C 57.98 H 7.84 Cl 9.51 N 7.51
Gef.: C 57.28 H 7.85 Cl 10.03 N 7.45

V. 9. 2. Benzyloxycarbonyl-L-asparagyl(β-tert.-butylester)-L-valyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t)

2.7 g (7.24 mMol) H-L-Val-L-Tyr-OBu^t·HCl und 0.9 ml (8 mMol) N-Methylmorpholin werden in CH_2Cl_2/DMF (9:1) gelöst und mit 3.1 g (7.3 mMol) Z-L-Asp(β-OBu^t)-OSu versetzt. Nach 18 h wird die Reaktionslösung eingeengt, in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung, mit Wasser, mit 10%iger Na_2CO_3-Lösung und mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Die Kristallisation erfolgt aus EE/Ether/Petrolether. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 3.6 g (78.3% d. Th.)
Fp.: 112 °C (Sint.), 137 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 25.5° ± 0.5° (c=2, MeOH)

$C_{34}H_{47}N_3O_9$ (641.76) Ber.: C 63.63 H 7.38 N 6.55
Gef.: C 63.19 H 7.38 N 6.40

V. 9. 2. 1. L-Asparagyl(β-tert.-butyl)-L-valyl-L-tyrosin-tert.-butylester·Hydrochlorid (H-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t·HCl)

3.1 g (4.83 mMol) Z-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-Tyr-OBu^t werden in 100 ml MeOH/DMF (9:1) gelöst und mit 500 mg Pd(10%)/C-Katalysator versetzt. Anschließend wird 2.5 h im Durchflußverfahren hydriert, wobei der pH durch Zugabe von methanolischer HCl bei 3.8 gehalten wird. Nach Entfernen des Katalysators wird mehrmals mit Methanol zur Trockene eingeengt. Das Produkt wird 24 h im Hochvakuum über KOH getrocknet. Einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 2.6 g (100% d. Th.)

Fp.: Oel

$C_{26}H_{42}ClN_3O_7$ (544.09)

V. 9. 3. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl(ß-tert.-butylester)-L-valyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t)

2.6 g (4.78 mMol) H-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t·HCl und 0.4 ml (5 mMol) N-Methylmorpholin werden in 40 ml DMF gelöst. Sobald die Reaktionsmischung klar ist, werden 2.53 g (5.3 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OSu, gelöst in wenig DMF, hinzugefügt. Nach 48 h wird eingeengt in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäure (2x), mit Wasser (1x), mit 10%iger $NaHCO_3$-Lösung (3x) und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wird etwas eingeengt und mit Ether/Petrolether gefällt. Umkristallisiert wird aus EE/Petrolether.

Ausbeute: 3.2 g (77.1% d. Th.)
Fp.: 139-140 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 16° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{45}H_{67}N_5O_{12}$ (870.05) Ber.: C 62.12 H 7.76 N 8.05
Gef.: C 62.32 H 7.63 N 8.05

V. 9. 4. N^{α},N^{ω},N^{δ}-Tris-(benzyloxycarbonyl)-L-arginyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl-(ß-tert.-butylester)-L-valyl-L-tyrosin-tert.-butylester (Z-L-Arg(Z_2)-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t)

3.0 g (3.45 mMol) Z-L-Lys(Boc)-L-Asp(ß-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t werden bei pH 4.3 entacyliert. Nach 3 h wird der Katalysator abfiltriert und das Filtrat mehrmals eingeengt. Der resultierende schaumige Rückstand, welcher dünnschichtchromatographisch einheitlich ist (System A und D), wird im Hochvakuum über KOH getrocknet (Ausbeute 2.6 g, 99% d. Th.). Diese 2.6 g (3.36 mMol) der Aminokomponente werden zusammen mit 0.4 ml (5 mMol) N-Methyl

morpholin, 454 mg (3.36 mMol) HOBt und 2.1 g (3.6 mMol) Z-L-Arg(Z_2)-OH in 50 ml DMF/CH_2Cl_2 (1:1) gelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf -8 °C gekühlt und mit 742 mg (3.6 mMol) DCCI, gelöst und vorgekühlt in wenig DMF, versetzt. Es wird 3 h in der Kälte und 60 h bei RT gerührt. Anschließend wird in der Kälte vom ausgefallenenDicyclohexylharnstoff befreit und zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen und nacheinander mit 20%iger Citronensäure (3x), mit Wasser (1x), mit 10%iger Na_2CO_3-Lösung sowie mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Die EE-Phase wird mit Na_2SO_4 getrocknet, etwas eingeengt und das Pentapeptid mit Ether/Petrolether gefällt. Aus DMF/Wasser wird umkristallisiert. Das Pentapeptid ist in den Systemen A, D und H einheitlich.

Ausbeute: 3.3 g (82.5% d. Th.)
Fp.: 100-102 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 4.3° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{67}H_{92}N_9O_{17}$ (1295.52) Ber.: C 62.12 H 7.16 N 9.73
Gef.: C 62.51 H 7.14 N 9.74

V. 10. Darstellung von Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36) und Thymopoietin (32-36)

V. 10. 1. Thymopoietin (34-36), (H-L-Asp-L-Val-L-Tyr-OH·TFA)

600 mg (1 mMol) H-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden bei RT 30 Minuten in 10 ml TFA gerührt. Danach wird mehrmals vorsichtig mit MeOH eingeengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und zweimal mit Ether extrahiert. Nach Einengen zur Trockene wird in Wasser aufgenommen und zweimal lyophilisiert. Chromatographisch rein in den Systemen A, J und K.

Ausbeute: 310 mg (60.9% d. Th.)
Fp.: 202-203 °C (amorph)

Racemattest: 4.1% D-Asp, 0.6% D-Val, 1.8% D-Tyr

Aminosäureanalyse: (6N HCl, 18 h, 110 °C, Zusatz von Phenol)

	Asp	Val	Tyr
Ber.:	1.00	1.00	1.00
Gef.:	0.97	1.00	1.00

$C_{20}H_{26}F_3N_3O_9$ (509.44) Ber.: C 47.15 H 5.14 N 8.25
Gef.: C 47.05 H 5.21 N 8.07

V. 10. 2. Thymopoietin (33-36), (H-L-Lys-L-Asp-L-Val-L-Tyr-OH·2TFA)

200 mg (0.24 mMol) H-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t werden 1 h in 5 ml TFA gerührt. Danach wird die Lösung mit MeOH versetzt und eingeengt. Nachdem noch zweimal vorsichtig mit MeOH eingeengt wurde, wird in Wasser aufgenommen und zweimal mit Ether extrahiert. Nach vollständigem Einengen wird in Wasser aufgenommen und zweimal lyophilisiert. Einheitlich in System A, J und K.

Ausbeute: 112 mg (61.9% d. Th.)
Fp.: 176-178 °C (amorph)

Racemattest: 1.1% D-Lys, 6.1% D-Asp, 0.9% D-Val, 2.0% D-Tyr

Aminosäureanalyse: (6N HCl, 20 h, 110 °C, Zusatz von Phenol)

	Lys	Asp	Val	Tyr
Ber.:	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef.:	0.98	1.00	0.92	1.04

$C_{28}H_{39}F_6N_5O_{12}$ (751.04) Ber.: C 44.78 H 5.23 N 9.33
Gef.: C 44.42 H 5.76 N 9.39

V. 10. 3. Thymopoietin (32-36), (H-L-Arg-L-Lys-L-Asp-L-Val-L-Tyr-OH·3 AcOH)

V. 10. 3. 1. Freisetzen des geschützten Thymopoietin (32-36), (Z-L-Arg(Mbs)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr(Bu^t)-OBu^t)

200 mg (0.16 mMol) des geschützten Pentapeptids werden mit 1.7 ml Methansulfonsäure und 0.1 ml Anisol versetzt. Diese Mischung wird 2 h gerührt und danach mit 50 ml Ether versetzt. Die ausgefallenen weißen Kristalle werden abfiltriert, in Wasser aufgenommen und auf eine Säule (1 x 10 cm), gefüllt mit Amberlite IRA 410 (Acetatform), gegeben. Das aufgefangene Eluat wird lyophilisiert und danach an Sephadex LH 20 (Säule 2 m x 1 cm) mit H_2O/MeOH (9:1) weiter gereinigt. Die entsprechenden Fraktionen werden anschließend noch zweimal lyophilisiert. Einheitlich in den Systemen A, J und K.

Ausbeute: 43 mg (37% d. Th.)

Racemattest: 2.1% D-Arg, 1.6% D-Lys, 6,0% D-Asp,
0.8% D-Val, 3.1% D-Tyr.

Aminosäureanalyse: (6N HCl, 24 h, 110 °C, Zusatz von Phenol)

	Arg	Lys	Asp	Val	Tyr
Ber.:	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef.:	1.01	0.94	1.00	0.99	0.78

$C_{36}H_{61}N_9O_{15}$ (859.87) Ber.: C 50.28 H 7.15 N 14.66
Gef.: C 49.93 H 6.65 N 14.29

V. 10. 3. 2. Freisetzen des geschützten Thymopoietin (32-36), (Z-L-Arg(Z_2)-L-Lys(Boc)-L-Asp(β-OBu^t)-L-Val-L-Tyr-OBu^t)

1.3 g (1 mMol) des geschützten Pentapeptids wird mit 10 ml 1.2N HCl in Eisessig übergossen und 3.5 h gerührt. Danach wird mehrmals vorsichtig mit Methanol eingeengt, in wenig Methanol aufgenommen und das Produkt mit EE/Ether/Petrolether gefällt.

Nach Absaugen und Trocknen des Produktes (450 mg, 45% d. Th.) wird die Verbindung in MeOH/DMF und wenig Wasser gelöst und mit 100 mg Pd(10%)/C-Katalysator versetzt. Anschließend wird 2 h im Durchflußverfahren hydriert, die Reaktionslösung über Celite filtriert und eingeengt. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und zweimal mit EE extrahiert. Die Wasserphase wird eingeengt, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, von Ungelöstem befreit und danach lyophilisiert. Dieses Rohprodukt wird an Sephadex G-25 (Superfine), (Säule 80 x 3 cm, Eluens: 200 mMol NH_4Ac, pH 6.75, Fraktionen: 10.2 ml), weitergereinigt. Fraktionen 47 bis 56 werden gesammelt und zweimal lyophilisiert. Das freie Pentapeptid ist chromatographisch einheitlich in den Systemen A, J und K.

Ausbeute: 54.4 mg (6.3% d. Th.)

Racemattest: 1.1% D-Arg, 0.3% D-Lys, 9.7% D-Asp, 0.6% D-Val, 6.4% D-Tyr.

Aminosäureanalyse: (6N HCl, 24 h, 110 °C, Zusatz von Phenol)

	Arg	Lys	Asp	Val	Tyr
Ber.:	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Gef.:	1.03	0.91	1.00	1.05	0.95

$C_{36}H_{61}N_9O_{15}$ (859.87) Ber.: C 50.28 H 7.15 N 14.66
Gef.: C 50.09 H 7.28 N 14.53

V. 11. Synthese von Thymosin β9 (18-29)

V. 11. 1. Darstellung des Fragments 25-29, N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparagyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin·Hydrochlorid (H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH·HCl)

V. 11. 1. 1. L-Prolin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Pro-OMe·HCl)

H-L-Pro-OMe·HCl wird nach Guttmann[284] in 90.3%iger Ausbeute synthetisiert. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Fp.: 72-74 °C, Lit. 71 °C

$[\alpha]_D^{22}$: - 34.1° ± 0.5° (c=2.1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{24}$: - 32.6° (c=2.1, MeOH)

$C_6H_{12}ClNO_2$ (165.62) Ber.: C 43.51 H 7.30 Cl 21.41 N 8.46
Gef.: C 43.16 H 7.65 Cl 21.98 N 8.86

V. 11. 1. 2. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-leucin (Adpoc-L-Leu-OH)

13.12 g (100 mMol) L-Leucin, 8.4 g (100 mMol) $NaHCO_3$ und 10.2 g (100 mMol) Na_2CO_3 werden in 200 ml Wasser und 150 ml Dioxan gelöst und auf -5 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur werden innerhalb einer Stunde 26.4 g (110 mMol) Adpoc-F, gelöst in 100 ml Dioxan, zugetropft. Nach 16 h wird die Reaktionslösung weitgehend von Dioxan befreit und die alkalische Phase zweimal mit Petrolether (40-60 °C) extrahiert. Danach wird die Wasserphase mit konz. Citronensäurelösung auf pH 3.5 angesäuert. Das ausfallende Produkt wird abgesaugt und mit mehreren Portionen Wasser nachgewaschen. Umkristallisiert wird aus EE/Petrolether (40-60 °C). Adpoc-L-Leu ist chromatographisch sauber in den Systemen A und D.

Ausbeute: 33.2 g (94.7% d. Th.)
Fp.: 176-177 %C, Lit. 176 %C[285]

$[\alpha]_D^{21}$: - 12.0° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{22}$: - 12.8 ° (c=1, MeOH)

$C_{20}H_{33}NO_4$ (351.49) Ber.: C 68.34 H 9.46 N 3.99
Gef.: C 68.13 H 9.53 N 4.00

V. 11. 1. 3. 1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Adpoc-L-Leu-L-Pro-OMe)

37.0 g (105.3 mMol) Adpoc-L-Leu-OH, 17.5 g (105.3 mMol) L-Pro-OMe·HCl, 14.2 g (105.3 mMol) HOBt und 11.6 ml (106 mMol) N-Methylmorpholin werden in 260 ml DMF/CH_2Cl_2 (3:1) gelöst und auf -10 °C abgekühlt. Nach 10 Minuten fügt man eine vorgekühlte Lösung von 23.9 g (116 mMol) DCCI, gelöst in wenig DMF, hinzu. Nach 1 h Rühren in der Kälte und 11 h bei RT filtriert man bei 0 °C den entstandenen Dicyclohexylharnstoff ab und engt im Vakuum ein. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, von Ungelöstem nochmals befreit und mit 20%iger Citronensäure (3x), mit Wasser (1x), mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung (3x) und nochmals mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Nach Trocknen mit Na_2SO_4 wird etwas eingeengt, mit Ether versetzt und mit Hexan zur Fällung gebracht. Umkristallisation erfolgt aus EE/Petrolether. Das geschützte Dipeptid ist einheitlich in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 46.2 g (94.9% d. Th.)
Fp.: 144 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 50.0° ± 0.5° (c=1, $CHCl_3$)

$C_{26}H_{42}N_2O_5$ (462.63) Ber.: C 67.50 H 9.15 N 6.06
Gef.: C 67.30 H 9.06 N 6.13

V. 11. 1. 4. L-Leucyl-L-prolin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Leu-L-Pro-OMe·HCl)

35.0 g (75.65 mMol) Adpoc-L-Leu-L-Pro-OMe werden 5 Minuten mit 200 ml 4N HCl in Dioxan gerührt. Nach Einengen wird mehrmals mit MeOH eingeengt. Der feste Schaum wird in $CHCl_3$ aufgenommen und mit Ether bis zur beginnenden Trübung versetzt. Die

farblosen Kristalle werden abgesaugt und über KOH getrocknet. Die Verbindung ist einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 20.4 g (96.9% d. Th.)
Fp.: 190 °C
$[\alpha]_D^{21.5}$: - 54.0° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{12}H_{23}ClN_2O_3$ (278.78) Ber.: C 51.70 H 8.32 Cl 12.72 N 10.05
Gef.: C 51.72 H 8.27 Cl 12.76 N 10.25

V. 11. 1. 5. L-Threonin-methylester (H-L-Thr-OMe)

Der Ester wird nach Vogler[286] in 90.1%iger Ausbeute dargestellt. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Fp.: 68-69 °C, Lit. 70-72 °C
$[\alpha]_D^{21}$: + 3.8° ± 0.5° (c=2, MeOH)
$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: + 5° (c=3, MeOH)

$C_5H_{11}NO_3$ (133.15) Ber.: C 45.10 H 8.33 N 10.52
Gef.: C 45.05 H 8.49 N 10.47

V. 11. 1. 6. Benzyloxycarbonyl-L-threonin-methylester (Z-L-Thr-OMe)

Die Verbindung wird aus H-L-Thr-OMe und Z-Cl nach Schröder[287] synthetisiert. Z-L-Thr-OMe ist chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Ausbeute: 92.0% d. Th.
Fp.: 89-91 °C, Lit. 90 °C
$[\alpha]_D^{22}$: -17.1° ± 0.5° (c=1, MeOH)
$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: -17.3° (c=1, MeOH)

$C_{13}H_{17}NO_5$ (267.28) Ber.: C 58.42 H 6.41 N 5.24
Gef.: C 57.90 H 6.45 N 5.38

V. 11. 1. 7. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-methylester (Z-L-Thr(Bu^t)-OMe)

Diese Verbindung wird nach Schröder mit 94% Ausbeute hergestellt. Das Produkt ist in den Systemen A, D und H einheitlich.

Fp.: Oel, welches bei +10 °C erstarrt.

$[\alpha]_D^{23}$: + 4.2° ± 0.5° (c=1, DMF)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: + 6.3° (c=1, DMF)[288]

$C_{17}H_{25}NO_5$ (323.39) Ber.: C 63.14 H 7.79 N 4.33
Gef.: C 63.23 H 7.87 N 4.34

V. 11. 1. 8. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin·Dicyclohexylammonium (Z-L-Thr(Bu^t)-OH·DCHA)

Z-L-Thr(Bu^t)-OMe wird in 82.3%iger Ausbeute nach Schröder[288] verseift und in das Dicyclohexylammoniumsalz überführt. Einheitlich in System A und System D.

Fp.: 122-126 °C, Lit. 126-126.5 °C

$[\alpha]_D^{20}$: + 6.0° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{23}$: + 8.3° (c=1, DMF)

$C_{28}H_{46}N_2O_5$ (490.69) Ber.: C 68.54 H 9.45 N 5.71
Gef.: C 69.20 H 9.60 N 5.90

V. 11. 1. 9. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonin-hydroxysuccinimidester (Z-L-Thr(Bu^t)-OSu)

118.5 g (241.5 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-OH·DCHA werden in EE suspendiert und bei 0 °C mit ca. 1 Mol Citronensäurelösung versetzt. Es wird so lange gerührt, bis die Lösung klar ist. Nach Abtrennen der organischen Phase wird mit Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Volumen auf die Hälfte eingeengt. Nach Abkühlen der Lösung auf -15 °C werden 27.9 g (242 mMol) HOSu und anschließend portionsweise 50.0 g (242 mMol) DCCI hinzugefügt. Es wird 24 h bei 0 °C gerührt, vom ausgefallenen Di-

cyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung vollständig eingeengt. Der hellbraune ölige Rückstand wird in CH_2Cl_2 aufgenommen und mit Petrolether (40-60 °C) versetzt. Umkristallisiert wird aus Isopropanol.

Ausbeute: 87.7 g (89.4% d. Th.)
Fp.: 86-88 °C, Lit. 90 °C[289)]

$[\alpha]_D^{21}$: - 3.8° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D.\ Lit.}^{23}$: - 6.3° (c=1, Dioxan)

$C_{20}H_{26}N_2O_7$ (406.44) Ber.: C 59.10 H 6.45 N 6.89
Gef.: C 58.46 H 6.49 N 6.85

V. 11. 1. 10. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

20.0 g (71.7 mMol) H-L-Leu-L-Pro-OMe·HCl werden in 300 ml DMF/CH_2Cl_2 (9:1) gelöst und mit 7.9 ml (71.8 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nachdem die Reaktionslösung auf -5 °C abgekühlt wurde, tropft man 30.6 g (75.3 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-OSu, gelöst in CH_2Cl_2, hinzu. Nach 20 h wird vollständig einrotiert, in EE aufgenommen und mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit Wasser (1x) und mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung (3x) gewaschen. Nach Neutralwaschen wird über Na_2SO_4 getrocknet. Kristallisationsversuche schlugen fehl. Das Tripeptid ist in den Systemen A, D und H einheitlich.

Ausbeute: 30.5 g (79.6% d. Th.)
Fp.: Oel

$[\alpha]_D^{21.5}$: - 31.1° ± 0.5° (c=1, $CHCl_3$)

$C_{28}H_{43}N_3O_7$ (533.67) Ber.: C 63.02 H 8.12 N 7.87
Gef.: C 63.36 H 8.18 N 7.83

V. 11. 1. 11. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH

7.5 g (14 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe werden in 50 ml Methanol gelöst und mit 14 ml 1N NaOH-Lösung versetzt. Nach 5 h wird die Reaktionslösung mit Wasser verdünnt und danach mit EE (3x) extrahiert. Die alkalische Wasserphase wird mit 1N HCl-Lösung auf pH 4.5 gebracht und mit EE überschichtet. Nach Abtrennen der EE-Phase wird diese über Na_2SO_4 getrocknet und etwas eingeengt. Nach Zugabe von Ether/Petrolether beginnt das Produkt auszukristallisieren. Es wird aus EE/Ether/Petrolether umkristallisiert. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 5.3 g (72.6% d. Th.)
Fp.: 78-80 °C
$[\alpha]_D^{23.5}$: - 55.2° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$C_{27}H_{41}N_3O_7$ (519.64) Ber.: C 62.31 H 7.95 N 8.09
Gef.: C 61.95 H 8.06 N 7.89

V. 11. 1. 12. Benzyloxycarbonyl-L-asparagin (Z-L-Asn-OH)

Z-L-Asn-OH wird nach Boissonas[290] aus L-Asparagin und Z-Cl in 83.2%iger Ausbeute dargestellt. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Fp.: 157-159 °C, Lit. 164-165 °C
$[\alpha]_D^{23.5}$: - 6.0° ± 0.5° (c=1, DMF)
$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{22}$: - 6.5° (c=1, 1N $NaHCO_3$)

$C_{12}H_{14}N_2O_5$ (266.25) Ber.: C 54.13 H 5.30 N 10.52
Gef.: C 54.07 H 5.43 N 10.75

V. 11. 1. 13. Benzyloxycarbonyl-L-asparagin-p-nitro-phenylester (Z-L-Asn-ONp)

Z-L-Asn-ONp wird nach Wünsch[291] mit 56% Ausbeute synthetisiert. Die Verbindung ist einheitlich in System D.

Fp.: 147-148 °C, Lit. 153-154 °C

$[\alpha]_D^{21.5}$: - 40.8° ± 0.5° (c=1, DMF)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 34.6° ± 0.5° (c=2, DMF)

$C_{18}H_{17}N_3O_7$ (387.35) Ber.: C 55.82 H 4.42 N 10.85
Gef.: C 56.77 H 4.45 N 10.92

V. 11. 1. 14. Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (Z-L-Asn-L-Thr-(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH)

4 g (7.7 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH werden in Gegenwart von 200 mg Pd(10%)/C im Durchflußverfahren 3 h hydriert (Lösungsmittel: 200 ml MeOH/H_2O). Nach Entfernen des Katalysators wird zur Trockene eingeengt (Ausbeute: 2.8 g, 95% d. Th.) und 150 ml DMF/CH_2Cl_2 aufgenommen. Die Reaktionslösung wird auf 0 °C gekühlt und mit 0.8 ml (7.3 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Anschließend läßt man innerhalb 1 h 3.1 g (8 mMol) Z-L-Asn-ONp, gelöst in kaltem DMF, zutropfen. Nach 48 h wird die Reaktionslösung eingeengt und der Rückstand zwischen EE/Na_2CO_3-Lösung verteilt. Nachdem mit Citronensäure ein pH von 3 eingestellt wurde, wird die EE-Phase abgetrennt und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird etwas eingeengt und das Tetrapeptid durch Zugabe von Ether/Petrolether gefällt. Umkristallisiert wird aus DMF/Wasser. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 3.1 g (68% d. Th.)

Fp.: 121-123 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 15.8° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{31}H_{47}N_5O_9$ (633.74) Ber.: C 58.75 H 7.48 N 11.05
Gef.: C 58.92 H 7.36 N 10.72

V. 11. 1. 15. L-Asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin·Hydrochlorid (H-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH·HCl)

2.5 g (4 mMol) Z-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH werden in 200 ml MeOH/Wasser (19:1) gelöst und mit 300 mg (Pd(10%)/C-Katalysator versetzt. Es wird 2 h bei pH 5 (Zugabe von methanolischer HCl mittels Autotitrator) entacyliert. Nach Filtration wird mehrmals eingeengt, in wenig MeOH aufgenommen und die Verbindung durch Zugabe von EE/Ether gefällt. Chromatographisch einheitlich in System D.

Ausbeute: 1.9 g (90.4% d. Th.)
Fp.: 205-208 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 8.9° ± 0.5° (c=0.7, MeOH)

$C_{23}H_{42}ClN_5O_7$ (536.07) Ber.: C 51.53 H 7.90 N 6.61
Gef.: C 51.32 H 7.76 N 6.89

V. 11. 1. 16. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (Z-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr-(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH)

1.5 g (2.8 mMol) H-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH·HCl werden in 50 ml DMF/CH_2Cl_2 (4:1) gelöst und mit 0.6 ml (5.6 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf 0 °C gibt man 1.43 g (3 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OSu, gelöst in CH_2Cl_2, hinzu. Nach 36 h wird die Reaktionslösung zur Trockene eingeengt, in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (3x) und mit Wasser (2x) gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird etwas eingeengt und die Verbindung mit Ether/Petrolether gefällt. Das Pentapeptid wird aus MeOH/Wasser umkristallisiert. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 1.75 g (73.2% d. Th.)
Fp.: 132-134 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 10.8° ± 0.5° (c=0.16, DMF)

$C_{42}H_{67}N_7O_{12}$ (862.04) Ber.: C 58.52 H 7.83 N 11.37
Gef.: C 58.49 H 8.02 N 11.09

V. 11. 1. 17. N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin·Hydrochlorid (H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH·HCl)

1.0 g (1.16 mMol) Z-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH werden in 100 ml MeOH/Wasser (98:2) gelöst und mit Pd(10%)/C-Katalysator versetzt. Es wird 4.5 h bei pH 4.5 hydriert. Nach Entfernen des Katalysators wird zweimal mit MeOH eingeengt, in wenig MeOH aufgenommen und das Produkt durch Zugabe von Ether/Petrolether ausgefällt. Einheitlich in System D.

Ausbeute: 805 mg (90.7% d. Th.)
Fp.: 158-161 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 12.4° ± 0.5° (c=0.05, MeOH)

$C_{32}H_{62}ClN_7O_{10}$ (764.36) Ber.: C 53.43 H 8.18 N 12.83
Gef.: C 52.19 H 8.36 N 11.98

V. 11. 2. Darstellung des Fragmentes 22-24, Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutaminsäure (γ-tert.-butylester)-hydrazid (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-N_2H_3)

V. 11. 2. 1. Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure (Z-L-Glu-OH)

Umsetzung von L-Glutaminsäure mit Z-Cl nach Vorschrift[292] liefert in 87%iger Ausbeute Z-L-Glu-OH. Chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Fp.: 116 °C, Lit. 119-121 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 7.5° + 0.5° (c=10, HAc)
$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 7.9° (c=10, HAc)

$C_{13}H_{15}NO_6$ (281.27) Ber.: C 55.52 H 5.38 N 4.98
Gef.: C 55.31 H 5.37 N 4.97

V. 11. 2. 2. Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäureanhydrid (Z-L-Glu$\overline{\text{-O}}$)

Das Anhydrid des Glutaminsäurederivats wird nach Gibian[293] mit 71% Ausbeute dargestellt.

Fp.: 91-92 °C, Lit. 91-92 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 3.7° ± 0.5° (c=1, $CHCl_3$)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: - 43.0° (c=10, HAc)

$C_{13}H_{13}NO_5$ (263.20) Ber.: C 59.31 H 4.98 N 5.32
Gef.: C 59.69 H 4.32 N 5.65

V. 11. 2. 3. Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure-α-methylester (Z-L-Glu-α-OMe)

Z-L-Glu-α-OMe wird nach Klieger[294] in 51%iger Ausbeute dargestellt. Die Verbindung ist einheitlich in System D.

Fp.: 67-68 °C, Lit. 68-69 °C

$[\alpha]_D^{21.5}$: - 23.8° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: - 25.9° (c=1.06, MeOH)

$C_{14}H_{17}NO_6$ (295.29) Ber.: C 56.95 H 5.80 N 4.74
Gef.: C 57.16 H 5.86 N 4.79

V. 11. 2. 4. Benzyloxycarbonyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester (Z-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe)

Umsetzung von Isobutylen mit Z-L-Glu-α-OMe nach Vorschrift[295] liefert in 84.2%iger Ausbeute Z-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe. Einheitlich in den Systemen A und D.

Fp.: Oel, Lit. Oel

$[\alpha]_D^{23}$: + 3.1° ± 0.5° (c=1, $CHCl_3$)

$C_{18}H_{25}NO_6$ (351.40) Ber.: C 61.53 H 7.17 N 3.99
Ber.: C 60.74 H 7.37 N 3.88

V. 11. 2. 5. L-Glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester·Hydrochlorid (H-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl)

Die Entacylierung von Z-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe nach Vorschrift[295] liefert in 75.5%iger Ausbeute H-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Fp.: 122 °C, Lit. 125-126 °C

$[\alpha]_D^{21}$: + 27.5° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{25}$: + 23.9° (c=1.02, MeOH)

$C_{10}H_{20}ClNO_4$ (253.48) Ber.: C 47.33 H 7.95 N 5.52 Cl 13.98
Gef.: C 47.29 H 8.09 N 5.52 Cl 14.33

V. 11. 2. 6. Benzyloxycarbonyl-L-glutamin (Z-L-Gln-OH)

Z-L-Gln-OH wird mit 94% Ausbeute nach Vorschrift[293] synthetisiert. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Fp.: 132-134 °C, Lit. 133-135 °C

$[\alpha]_D^{23}$: - 5.6° ± 0.5° (c=1, EtOH)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 7.1° (c=2, EtOH)

$C_{13}H_{16}N_2O_5$ (280.28) Ber.: C 55.70 H 5.75 N 10.00
Gef.: C 55.27 H 5.87 N 10.22

V. 11. 2. 7. Benzyloxycarbonyl-L-glutamin-p-nitrophenylester (Z-L-Gln-ONp)

Der Aktivester wird in 57%iger Ausbeute nach Zitat[296] dargestellt. Einheitlich in System D.

Fp.: 153-155 °C, Lit. 155-157 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 19.8° ± 0.5° (c=2, DMF)

$[\alpha]_{D,\ Lit.}^{20}$: - 24.4° (c=2, DMF)

$C_{19}H_{19}N_3O_7$ (401.38) Ber.: C 56.86 H 4.77 N 10.47
Gef.: C 57.05 H 5.07 N 10.47

V. 11. 2. 8. Benzyloxycarbonyl-L-glutaminyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester (Z-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe)

7.9 g (20 mMol) Z-L-Gln-ONp werden zu einer Lösung aus 5.0 g (20 mMol) H-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl und 2.2 ml (20 mMol) N-Methylmorpholin in 100 ml CH_2Cl_2 und 50 ml DMF bei 5 °C gegeben. Nach 24 h wird eingeengt, in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (2x) und gesättigter Na_2CO_3-Lösung gewaschen, bis das Waschwasser farblos ist. Nach Neutralwaschen wird über Na_2SO_4 getrocknet, etwas eingeengt und das Produkt mit Ether/Petrolether gefällt. Umkristallisiert wird aus EE/Ether/Petrolether. Das Dipeptid ist in den Systemen A, D und H einheitlich.

Ausbeute: 4.2 g (44.5% d. Th.)
Fp.: 132-135 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 18.5° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{23}H_{33}N_3O_8$ (479.53) Ber.: C 57.61 H 6.94 N 8.76
Gef.: C 57.51 H 6.68 N 8.94

V. 11. 2. 9. L-Glutaminyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester·Hydrochlorid (H-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl)

4.0 g (8.35 mMol) des vorstehenden Dipeptids werden in 100 ml MeOH und 4 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 450 mg Pd(10%)/C-Katalysator wird 4 h im Durchflußverfahren hydriert. Dabei wird der pH durch Zugabe methanolischer HCl auf 5 gehalten. Anschließend wird über Celite abfiltriert und zur Trockene eingeengt. Kristallisationsversuche schlugen fehl. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 2.5 g (78% d. Th.)
Fp.: Oel
$[\alpha]_D^{23}$: - 5.8° ± 0.5° (c=0.5, MeOH)

$C_{15}H_{28}ClN_3O_6$ (381.86) Ber.: C 47.18 H 7.39 N 11.00
Gef.: C 46.78 H 7.54 N 10.83

V. 11. 2. 10. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe)

2.4 g (6.3 mMol) H-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl und 0.77 ml (7 mMol) N-Methylmorpholin werden in 120 ml CH_2Cl_2/DMF (5:1) gelöst und auf 2 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man innerhalb 15 Minuten 3.2 g (7.8 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-OSu, gelöst in CH_2Cl_2, zu. Nach 36 h wird die trübe Lösung filtriert und zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (3x), mit Wasser (1x), mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung (3x) und zuletzt mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen wird über Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt. Den Rückstand nimmt man in Ether auf und fällt das Produkt mit Hexan aus. Das Tripeptid ist in den Systemen A, D und H völlig einheitlich.

Ausbeute: 3.15 g (75.4% d. Th.)
Fp.: 98-101 °C
$[\alpha]_D^{20}$: + 7.2° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{31}H_{48}N_4O_{10}$ (636.74) Ber.: C 58.48 H 7.60 N 8.80
Gef.: C 59.03 H 7.76 N 8.82

V. 11. 2. 11. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-hydrazid (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-N_2H_3)

Zu einer Lösung von 2.5 g (3.9 mMol) Tripeptidester in 60 ml Methanol werden 3 ml (105 mMol) 95%iges Hydrazin in 15 ml Methanol zugegeben. Nach 36 h wird das gesamte Reaktionsgemisch auf Eiswasser gegossen und das ausgefallene Produkt abgesaugt. Der Rückstand wird mit kaltem Wasser, kaltem Methanol und Ether gewaschen. Die Verbindung ist chromatographisch rein in den Systemen A und D.

Ausbeute: 2.1 g (84% d. Th.)
Fp: 208-210 °C

$[\alpha]_D^{21}$: + 7.4° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{30}H_{48}N_6O_9$ (636.71) Ber.: C 56.59 H 7.60 N 13.19
Gef.: C 56.78 H 7.91 N 13.12

V. 11. 3. Darstellung des Fragments 18-21, N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminsäure-(γ-tert.-butylester)-hydrazid (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-N_2H_3)

V. 11. 3. 1. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe)

Zu einer auf 0 °C gekühlten Lösung von 5.0 g (20 mMol) H-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl und 2.2 ml (21 mMol) N-Methylmorpholin in 150 ml CH_2Cl_2/DMF (3:2) fügt man 7.7 g (22 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-OSu, gelöst in CH_2Cl_2, hinzu. Nach 24 h wird die Reaktionslösung eingeengt, in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit Wasser (1x), mit 10%iger $NaHCO_3$-Lösung und schließlich mit Wasser bis zur Neutralität gewaschen. Die EE-Phase wird über Na_2SO_4 getrocknet, etwas eingeengt und das Dipeptid mit Ether/Hexan ausgefällt. Umkristallisiert wird aus Ether/Hexan. Die Verbindung ist in den Systemen A, D und H einheitlich.

Ausbeute: 7.8 g (78% d. Th.)
Fp.: 107 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 15.0° ± 0.5° (c=0.5, DMF)

$C_{26}H_{40}N_2O_8$ (508.61) Ber.: C 61.40 H 7.93 N 5.51
Gef.: C 61.14 H 7.89 N 5.89

V. 11. 3. 2. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester (Z-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe)

7.5 g (14.7 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe werden entacyliert. Der resultierende Rückstand (5.75 g, 14 mMol) wird zusammen mit 1.4 ml (14.5 mMol) N-Methylmorpholin in 80 ml DMF gelöst und auf -3 °C gekühlt. Zu dieser Lösung tropft man innerhalb 20 Minuten 7.64 g (16 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OSu, gelöst in kaltem DMF, zu. Nach 48 h wird die Reaktionslösung eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit Wasser (1x), mit 5%iger Na_2CO_3-Lösung (2x) und mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wird eingeengt und aus EE/Ether/Petrolether kristallisiert. Das Tripeptid wird aus Ether/Petrolether umkristallisiert. Chromatographisch rein in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 6.9 g (67.1% d. Th.)
Fp.: 97-103 °C
$[\alpha]_D^{21.5}$: - 9.1° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$C_{37}H_{60}N_4O_{11}$ (736.90) Ber.: C 60.31 H 8.21 N 7.60
Gef.: C 59.99 H 8.13 N 7.93

V. 11. 3. 3. N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester·Hydrochlorid (H-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe·HCl)

6.2 g (8.4 mMol) voranstehenden Tripeptids werden in 200 ml MeOH/Wasser (98:2) gelöst, mit 700 mg Pd(10%)/C-Katalysator versetzt und bei pH 4.7 (Zugabe methanolischer HCl mittels Autotitrator) 2 h lang entacyliert. Nach Filtration über Celite wird mehrmals mit MeOH eingeengt. Das Produkt wird zweimal aus MeOH/Ether/Petrolether umkristallisiert. Einheitlich in System D.

Ausbeute: 4.4 g (82.9% d. Th.)
Fp.: 166-168 °C

$[\alpha]_D^{21}$: + 3.5° ± 0.5° (c=1, Dioxan)

$C_{29}H_{55}ClN_4O_9$ (639.23) Ber.: C 54.49 H 8.67 N 8.76
Gef.: C 53.43 H 8.74 N 9.05

V. 11. 3. 4. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-α-methylester (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-α-OMe)

4.0 g (6.25 mMol) vorstehenden Tripeptid·Hydrochlorid und 0.7 ml (7.3 mMol) N-Methylmorpholin werden in DMF/CH_2Cl_2 (4:1) gelöst und auf 3 °C abgekühlt. Anschließend fügt man 3.95 g (7 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-OSu, gelöst in kaltem CH_2Cl_2, hinzu. Nach 72 h wird zur Trockene eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen, mit 20%iger Citronensäurelösung (3x), mit Wasser (1x), mit 10%-iger $NaHCO_3$-Lösung (3x) und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen der EE-Phase mit Na_2SO_4 wird das Tetrapeptid mit Ether/Hexan ausgefällt. Umkristallisiert wird aus Ether/Petrolether. Die Verbindung ist in den Systemen A, D und H einheitlich.

Ausbeute: 3.9 g (63.8% d. Th.)
Fp.: 108-113 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 2.7° ± 0.5° (c=1, $CHCl_3$)

$C_{54}H_{94}N_6O_{14}$ (1051.37) Ber.: C 61.69 H 9.01 N 7.99
Gef.: C 61.14 H 8.85 N 8.36

V. 11. 3. 5. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminsäure(γ-tert.-butylester)-hydrazid (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-N_2H_3)

3.3 g (3.1 mMol) des vorstehenden Tetrapeptidmethylesters werden in 50 ml MeOH gelöst und mit 1.8 ml (60 mMol) 95%igem Hydra-

zin in 20 ml MeOH versetzt. Nach 96 h versetzt man die Reaktionslösung mit eiskaltem Wasser und filtriert ab. Der Rückstand wird mit Wasser und Ether nachgewaschen. Die Verbindung wird aus heißem Methanol umkristallisiert. Einheitlich in den Systemen A und D.

Ausbeute: 2.5 g (75.8% d. Th.)
Fp.: 114-116 °C
$[\alpha]_D^{23}$: - 7.8° ± 0.5° (c=0.2, DMF)
$C_{54}H_{94}N_8O_{13}$ (1051.38) Ber.: C 60.55 H 9.01 N 10.65
Gef.: C 60.63 H 8.80 N 10.96

V. 11. 4. Darstellung von Thymosin β9 (18-29), L-Lysyl-L-lysyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (H-L-Lys-L-Lys-L-Thr-L-Glu-L-Thr-L-Gln-L-Glu-L-Lys-L-Asn-L-Thr-L-Leu-L-Pro-OH)

V. 11. 4. 1. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH)

800 mg (1.05 mMol) H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH·HCl und 0.14 ml (1.3 mMol) N-Methylmorpholin werden in 20 ml DMF gelöst und auf -12 °C gekühlt (Lösung I). In einem zweiten Reaktionsgefäß werden 950 mg (1.5 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(-OBu^t)-N_2H_3 in 30 ml DMF gelöst und auf -15 °C gekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur fügt man 0.54 ml 4N HCl in Dioxan sowie 0.13 ml (1.4 mMol) tert.-Butylnitrit hinzu. Die Reaktionsmischung wird so lange gerührt, bis der Hydrazidtest negativ ausfällt (30 Minuten). Anschließend bringt man die Lösung mittels N-Methylmorpholin auf einen pH von 6.9. Sobald der pH-Wert eingestellt ist, fügt man dieser Lösung die Reak-

tionslösung I hinzu. Man läßt innerhalb 18 h auf RT erwärmen, beläßt das Reaktionsgemisch weitere 18 h bei RT und gießt danach in eiskalte 20%ige Citronensäurelösung. Das ausgefallene Produkt wird abgesaugt und aus DMF/Wasser umkristallisiert. Das Octapeptid ist in System A und System H einheitlich.

Ausbeute: 856 mg (61.3% d. Th.)

Fp.: 217-220 °C

$[\alpha]_D^{22}$: - 17.3° ± 0.5° (c=0.08, DMF)

$C_{64}H_{105}N_{11}O_{19}$ (1332.60) Ber.: C 57.68 H 7.94 N 11.56
Gef.: C 56.56 H 8.14 N 11.14

V. 11. 4. 2. O-tert.-Butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (H-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH)

800 mg (0.6 mMol) geschütztes Octapeptid werden in DMF/Wasser (9:1) gelöst und mit 100 mg Pd(10%)/C-Katalysator versetzt. Danach wird 6 h im Durchflußverfahren hydriert. Nach Filtration über Celite wird zweimal mit MeOH eingeengt. Zurück bleibt ein schaumiger Rückstand, welcher ein Schmelzintervall von 138-210 °C hat. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 690 mg (96% d. Th.)

$C_{56}H_{99}N_{11}O_{17}$ (1198.47) Ber.: C 56.12 H 8.33 N 12.86
Gef.: C 54.87 H 8.56 N 12.48

V. 11. 4. 3. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OH)

735 mg (0.7 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(-OBu^t)-N_2H_3 werden in 40 ml DMF gelöst, auf -15 °C gekühlt, mit 0.3 ml (1.2 mMol) 4N HCl in Dioxan sowie 0.07 ml (0.74 mMol) tert.-Butylnitrit versetzt und so lange gerührt, bis der Hydrazidtest negativ ausfällt (15 Minuten). Anschließend fügt man dieser Reaktionsmischung eine Lösung von 600 mg (0.5 mMol) des vorstehenden Octapeptids in 50 ml DMF (pH mit N-Methylmorpholin auf 8 eingestellt) hinzu. Nach 36 h wird die Reaktionslösung in eiskalte 2%ige Citronensäurelösung gegossen. Nach Filtration wird der Rückstand mehrmals mit Wasser gewaschen. Die Verbindung ist noch mit wenig Tetrapeptidhydrazid verunreinigt. Auf eine säulenchromatographische Reinigung wird verzichtet.

Ausbeute: 635 mg (57.7% d. Th.)
Fp.: 157-164 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 13.4° ± 0.5° (c=0.05, DMF)

$C_{109}H_{189}N_{17}O_{30}$ (2217.80) Ber.: C 59.03 H 8.59 N 10.74
Gef.: C 58.50 H 8.73 N 11.04

V. 11. 4. 4. H-L-Lysyl-L-lysyl-L-threonyl-L-glutamyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl-L-lysyl-L-asparaginyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-OH·4 Acetat (Thymosin ß9 (18-29))

150 mg (0.068 mMol) geschütztes Thymosin ß9 (18-29) werden in 7 ml Trifluoressigsäure 1 h lang gerührt. Danach wird die Säure bei 20 °C Badtemperatur und 12 Torr abdestilliert.

Der Rückstand wird im Hochvakuum über KOH getrocknet. Nach Lösen des Rückstandes in wenig Wasser wird durch eine Säule von 100 ml Amberlite IRA 400 (Acetatform) filtriert. Das Filtrat wird eingeengt, in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Zur Endreinigung wird an Sephadex G-25 (Superfine), (Säule 80 x 3 cm, Eluens 2N Essigsäure, Fraktionen à 6 ml) chromatographiert. Die Fraktionen 98 bis 105 werden gesammelt und lyophilisiert. Das Peptid ist in den Systemen A, D, H, J, K, L und M einheitlich.

Ausbeute: 54 mg (49.0% d. Th.)

Racemattest: 0.3% D-Lys, 0.1% D-Thr, 1.4% D-Glu,
5.1% D-Asp, 1.3% D-Leu, 6.0% D-Pro.

Aminosäureanalyse: (6N HCl, 110 °C, 24 h)

	Lys	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro
Ber.:	3.00	3.00	3.00	1.00	1.00	1.00
Gef.:	3.08	2.94	2.90	1.00	0.88	0.32

V. 12. Darstellung des geschützten, kupplungsfähigen Thymosin ß9 (18-29), N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-Leu-L-Pro-OMe)

V. 12. 1. Darstellung des Fragments 25-29, N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe·HCl)

V. 12. 1. 1. O.-tert.-Butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (H-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

20.0 g (37.5 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe werden in 150 ml MeOH und 5 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 2.5 g Pd(10%)/C wird 2 h im Durchflußverfahren hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird im Vakuum eingeengt, in wenig EE aufgenommen und das Produkt mit Ether/Petrolether gefällt. Die Verbindung ist in den Systemen A und D sauber.

Ausbeute: 14.5 g (96.9% d. Th.)

Fp.: 74-75 °C

$[\alpha]_D^{21.5}$: - 98.9° ± 0.5° (c=1, MeOH)

$C_{20}H_{37}N_3O_5$ (399.53) Ber.: C 60.13 H 9.33 N 10.52
Gef.: C 59.95 H 9.26 N 10.41

V. 12. 1. 2. Benzyloxycarbonyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Z-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

17.5 g (40 mMol) des vorstehenden Tripeptids werden in 400 ml CH_2Cl_2/DMF (3:1) gelöst und auf -5 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur werden 17.0 g (44 mMol) Z-L-Asn-ONp, gelöst in 50 ml DMF, zugetropft. Nach 24 h wird im Hochvakuum eingeengt, in EE aufgenommen und mit 20%iger Na_2CO_3-Lösung so lange gewaschen, bis die Wasserphase farblos ist. Danach wird einmal mit Wasser und zweimal mit Citronensäurelösung (20%) gewaschen. Nach Neutralwaschen wird die EE-Phase über Na_2SO_4 getrocknet und danach etwas eingeengt. Nach Zugabe von Ether/Petrolether fällt das Tetrapeptid innerhalb 48 h aus. In den Systemen A, D und H ist die Verbindung noch durch ca. 1% an Dicyclohexylharnstoff verunreinigt.

Ausbeute: 21.2 g (81.5% d. Th.)
Fp.: 188-192 °C
$[\alpha]_D^{22}$: - 36.0° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{32}H_{49}N_5O_9$ (647.77) Ber.: C 59.33 H 7.63 N 10.81
Gef.: C 59.38 H 7.52 N 10.75

V. 12. 1. 3. N^{α}-Benzyloxycarbonyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Z-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

9.7 g (15 mMol) Z-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe werden in 300 ml MeOH und 10 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1.0 g Pd(10%)/C wird 3 h im Durchflußverfahren hydriert. Der pH wird mittels Zugabe methanolischer HCl bei 4.8 gehalten. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird nochmals über Celite filtriert und im Vakuum eingeengt. Der entstehende amorphe Schaum ist in den Systemen A und D einheitlich. Ausbeute: 8.2 g (100%). 8.2 g (15 mMol) Tetrapeptid·Hydrochlorid werden in 200 ml CH_2Cl_2 gelöst, mit 1.6 ml (15 mMol) N-Methylmorpholin versetzt, und auf 0 °C abgekühlt. Danach fügt man portionsweise 7.2 g

(15 mMol) Z-L-Lys(Boc)-OSu hinzu und läßt 24 h bei RT reagieren. Nach Waschen mit 20%iger Citronensäurelösung (2x), mit Wasser (1x), mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung (4x) und mit Wasser bis zum Neutralpunkt wird die CH_2Cl_2-Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Nach Filtration und Einengen wird in $CHCl_3$ aufgenommen und das Pentapeptid mit Ether gefällt. Umkristallisiert wird aus DMF/Wasser. Das geschützte Pentapeptid ist in den Systemen A, D und H sauber.

Ausbeute: 10.9 g (83.3% d. Th.)
Fp.: 129-130 °C
$[\alpha]_D^{21}$: - 28.1° ± 0.5° (c=1, DMF)

$C_{43}H_{69}N_7O_{12}$ (876.06) Ber.: C 58.95 H 7.94 N 11.19
Gef.: C 59.08 H 8.06 N 10.97

V. 12. 1. 4. N^{ϵ}-tert.-Butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolinmethylester·Hydrochlorid (H-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe·HCl)

4.4 g (5 mMol) des vorstehenden Pentapeptids werden in 150 ml Methanol/DMF (3:2) gelöst und mit 500 mg Pd(10%)/C versetzt. Danach wird 3 h im Durchflußverfahren bei pH 4.5 entacyliert. Nach Filtration über Celite wird dreimal mit Methanol eingeengt, der Rückstand in EE aufgenommen und das Produkt mit Petrolether gefällt. Umkristallisation erfolgt aus MeOH/Ether/Petrolether. Die Verbindung ist chromatographisch einheitlich in System D.

Ausbeute: 2.7 g (71% d. Th.)
Fp.: 228-231 °C
$[\alpha]_D^{22}$: - 18.9° ± 0.5° (c=0.09, DMF)

$C_{35}H_{64}ClN_7O_{10}$ (778.39) Ber.: C 54.01 H 8.29 N 12.60
Gef.: C 53.36 H 7.87 N 11.67

V. 12. 2. Darstellung des geschützten Thymosin β9 (18-29), (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu-(γ-OBu^t)-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

V. 12. 2. 1. Benzyloxycarbonyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^ϵ-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

210 mg (0.33 mMol) Z-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-N_2H_3 werden in 10 ml DMF gelöst, auf -15 °C gekühlt und mit 0.18 ml (0.7 mMol) 4N HCl in Dioxan sowie 0.055 ml (0.4 mMol) tert.-Butylnitrit versetzt. Nachdem der Hydrazidtest negativ ausfällt (15 Minuten) wird die Lösung durch Zugabe von N-Methylmorpholin neutralisiert. Zu dieser Lösung fügt man eine auf -15 °C vorgekühlte Mischung, bestehend aus 290 mg (0.3 mMol) Pentapeptidmethylester·Hydrochlorid und 0.04 ml N-Methylmorpholin in 5 ml DMF, hinzu. Nach 36 h wird im Hochvakuum eingeengt. Der Rückstand wird in wenig DMF gelöst und das Octapeptid durch Zugabe von EE/Ether/Petrolether gefällt. Die Verbindung wird noch zweimal aus DMF/Wasser umkristallisiert. Das Produkt ist einheitlich in den Systemen A, D und H.

Ausbeute: 300 mg (67.1% d. Th.)

Fp.: 194-198 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 8.1° ± 0.5° (c=0.16, DMF)

$C_{65}H_{107}N_{11}O_{19}$ (1346.63) Ber.: C 57.98 H 8.01 N 11.44

Gef.: C 57.52 H 7.95 N 11.17

V. 12. 2. 2. O-tert.-Butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester·Hydrochlorid (H-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(γ-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe·HCl)

280 mg (0.2 mMol) des vorstehenden Octapeptids werden in Methanol/DMF (1:1) gelöst, mit 50 mg Pd(10%)/C versetzt und 5 h im Durchflußverfahren hydriert. Der pH wird durch Zugabe von methanolischer HCl bei 5 gehalten. Nach Filtration über Celite wird mehrmals mit Methanol eingeengt, der Rückstand in MeOH aufgenommen und das Produkt mit Ether gefällt. Chromatographisch einheitlich in System A und D.

Ausbeute: 243 mg (93.4% d. Th.)

Fp.: 208-212 °C

$[\alpha]_D^{20}$: - 14.0° ± 0.5° (c=0.05, MeOH)

$C_{57}H_{102}ClN_{11}O_{17}$ (1248.96)

V. 12. 2. 3. N^{α}-<1-(1-Adamantyl)-1-methylethoxycarbonyl>-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-glutaminyl-L-glutamyl(γ-tert.-butylester)-N^{ϵ}-tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl-L-asparaginyl-O-tert.-butyl-L-threonyl-L-leucyl-L-prolin-methylester (Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(-OBu^t)-L-Thr(Bu^t)-L-Gln-L-Glu(-OBu^t)-L-Lys(Boc)-L-Asn-L-Thr(Bu^t)-L-Leu-L-Pro-OMe)

200 mg (0.16 mMol) des vorstehenden Octapeptidmethylesters·Hydrochlorid und 0.03 ml (0.32 mMol) N-Methylmorpholin werden in 10 ml DMF gelöst und auf -15 °C gekühlt (Lösung I). In einem zweiten Kolben werden 310 mg (0.30 mMol) Adpoc-L-Lys(Boc)-L-Lys(Boc)-L-Thr(Bu^t)-L-Glu(-OBu^t)-N_2H_3 in 15 ml DMF gelöst,

auf -15 °C gekühlt und mit 0.15 ml (0.6 mMol) 4N HCl in Dioxan sowie 0.04 ml (0.4 mMol) tert.-Butylnitrit versetzt. Nach 20 Minuten neutralisiert man mit N-Methylmorpholin und fügt dieser Lösung die vorgekühlte Lösung I hinzu. Nach 36 h wird die Reaktionsmischung in Eiswasser gegossen und das ausgefallene Dodekapeptid abgesaugt. Das Rohprodukt wird aus DMF/Wasser umkristallisiert. Die Verbindung ist in den Systemen A und D einheitlich.

Ausbeute: 280 mg (77.8% d. Th.)

Fp.: 103-112 °C

$[\alpha]_D^{21}$: - 3.1° ± 0.5° (c=0.08, DMF)

Racemattest: 1.8% D-Lys, 0.5% D-Thr, 2.7% D-Glu,
6.3% D-Asp, 1.1% D-Leu, 5.3% D-Pro.

$C_{110}H_{191}N_{17}O_{30}$ (2231.83) Ber.: C 59.20 H 8.62 N 10.67
Gef.: C 60.07 H 8.72 N 10.27

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Synthesewege von Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36), Thymopoietin (32-36) sowie die erstmalige Synthese einer Partialsequenz von Thymosin β9 werden beschrieben. Zur Charakterisierung der Zwischenverbindungen werden vorwiegend die ^{13}C-NMR-Spektroskopie und die Felddesorptions-Massenspektrometrie herangezogen.

Die zunächst eingeschlagenen Synthesestrategien für die Thymopoietindarstellung lehnen sich an die tert.-Butyltaktik nach Schwyzer an. Die α-Aminogruppen werden mit der Z-Gruppe und die funktionellen Gruppen der Seitenkette mit tert.-Butyl-, Boc- und Mbs-Gruppen geschützt. Es werden sowohl die DCCI/HOBt- als auch die DCCI/HOSu-Methode zur Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren verwendet. Im Rahmen dieses Vergleichs stellt sich heraus, daß die DCCI/HOSu-Methode die besseren Ergebnisse liefert. In alternativen Synthesewegen wird die α-Aminogruppe mit säurelabilen Schutzgruppen, wie Adpoc bzw. Ddz, maskiert. Die selektive Abspaltung der α-Aminoschutzgruppen gelingt durch differenzierte Acidolyse. Bei all diesen eingeschlagenen Wegen können sämtliche Schutzgruppen am Ende der Synthese mit Methansulfonsäure nebenproduktfrei deblockiert werden. Im letzten Syntheseweg wird eine Synthese für Thymopoietin (32-36) beschrieben, bei welcher im Gegensatz zu den vorigen Strategien die Phenolfunktion des Tyrosins ungeschützt eingesetzt wird. Im Zuge dieser Strategie sollte Adpoc-Arg(Adpoc$_2$)-OH in den Peptidverband inkorporiert werden, um am Ende mit konzentrierter Trifluoressigsäure sämtliche Schutzgruppen abspalten zu können. Alle Versuche, dieses Argininderivat darzustellen, schlugen fehl. Stattdessen wird Z-Arg(Z$_2$)-OH verwendet, was sich gut in den Peptidverband einbauen läßt. Allerdings werden für die Abspaltung der Schutzgruppen zwei Schritte benötigt.

Die erstmalige Synthese einer Partialsequenz von Thymosin β9 gelingt ebenfalls. Zunächst wird das Fragment 25-29 (H-Lys(Boc)-Asn-Thr(Bu^t)-Leu-Pro-OH) schrittweise vom C-terminalen Ende her aufgebaut. In gleicher Weise werden Fragment 22-24 (Z-Thr(Bu^t)-

Gln-Glu(OBu^t)-N_2H_3) und Fragment 18-21 (Adpoc-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Thr(Bu^t)-Glu(OBu^t)-N_2H_3) synthetisiert. Die Umsetzung von Fragment 22-24 mit Fragment 25-29 unter Verwendung der Azidmethode nach Honzl-Rudinger liefert das Fragment 22-29. Nach Entfernung der Z-Gruppe des Octapeptids wird wiederum in einer Azidkupplung mit Fragment 18-21 zum geschützten Dodecapeptid verlängert. Dieses geschützte Thymosin ß9 (18-29) enthält lediglich säurelabile Schutzgruppen, welche durch Behandeln mit konzentrierter Trifluoressigsäure deblockiert werden können. Die Feinreinigung wird an Sephadex G-25 vorgenommen. Die Reinheit wird durch Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Fließmittelsystemen und durch HPLC-Messung kontrolliert.

Sämtliche in dieser Arbeit dargestellten Peptide (Thymopoietin (34-36), Thymopoietin (33-36), Thymopoietin (32-36) und Thymosin ß9 (18-29)) wirken in vitro auf das menschliche Tumorzellwachstum nicht hemmend.

VII. LITERATUR

1. D. Osoba und J.F.A.P. Miller, Nature 199, 653 (1963)
2. D. Osoba, J. Exp. Med. 122, 633 (1965)
3. A.L. Goldstein, F.D. Slater und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 1010 (1966)
4. J.F.A.P. Miller, Lancet 2, 748 (1961)
5. O.K. Archer und J.C. Pierce, Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 20, 26 (1961)
6. J.F.A.P. Miller, Proc. Roy. Soc. B 156, 415 (1962)
7. J.F.A.P. Miller, Ann. N. Y. Acad. Sci. 99, 340 (1962)
8. A.P. Dalmasso, C. Martinez und R.A. Good, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 205 (1962)
9. R.A. Good, A.P. Dalmasso, C. Martinez, O.K. Archer, J.C. Pierce und B.W. Papermaster, J. Exp. Med. 116, 773 (1962)
10. R.N. Levey, N. Trainin und L.E. Low, J. Natl. Cancer Inst. 31, 199 (1963)
11. R.A. Good und B.W. Papermaster, Adv. Immunol. 4, 1 (1964)
12. D. Osoba und J.F.A.P. Miller, J. Exp. Med. 119, 177 (1964)
13. C.A.H. Trench, S.W. Watson, F.C. Walker, R.S. Gardner und C.A. Green, Immunol. 10, 187 (1966)
14. J.F.A.P. Miller und G.F. Mitchell, J. Exp. Med. 128, 821 (1968)
15. J.F. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau und M.A. Bach, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 186 (1975)
16. O. Stutman, E. Yunis und R.A. Good, J. Exp. Med. 132, 583 (1970)
17. M. Dardenne, M. Papiernik, J.F. Bach und O. Stutman, Immunol 27, 299 (1974)
18. O. Stutman, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 89 (1975)
19. A.P. Dalmasso, C. Martinez, K. Sjodin und R.A. Good, J. Exp. Med. 118, 1089 (1963)
20. J.F. Bach, Ann. Rev. Pharmacol. Toxixol. 17, 281 (1977)
21. L.W. Law, N. Trainin, R.H. Levey und W.F. Barth, Science 143, 1049 (1964)
22. J.F.A.P. Miller und D. Osoba, Physiol. Rev. 47, 437 (1967)
23. N.B. Everett und R.W. Tyler, Int. Rev. Cytol. 22, 205 (1967
24. V. Lewis, J.J. Twoney und G. Goldstein, Lancet 2, 471 (1977
25. N. Trainin, Physiol. Rev. 54, 272 (1974)
26. M. Schlesinger, Isr. J. Med. Sci. 13, 343 (1977)
27. B.G. Aronson, B.D. Janovic und B.H. Waksman, Nature 194, 99 (1962)

28. H.N. Claman, E.A. Chaperon und R.F. Triplett, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122, 1167 (1966)

29. A.J.S. Davies, E. Leuchars, V. Wallis, R. Marchant und E.V. Elliot, Transplant. 5, 222 (1964)

30. J.F.A.P. Miller, A.H.E. Marshall und R.G. White, Adv. Immunol. 2, 111 (1962)

31. J.F.A.P. Miller und G.F. Mitchell, Proc. Natl. Acad. Sci. 59, 296 (1968)

32. D.E. Mosier, Science 158, 1573 (1967)

33. M.D. Cooper, R.D.A. Peterson, M.A. South und R.A. Good, J. Exp. Med. 123, 1975 (1966)

34. S. Broder, D. Poplack, J. Whang-Peng, M. Durm, C. Goldman, L. Muul und T.A. Waldmann, New Engl. J. Med. 298, 66 (1978)

35. L. Chess und S.F. Schlossman, Adv. Immunol. 25, 213 (1977)

36. P. Erb und M. Feldmann, Call. Immunol. 19, 356 (1975)

37. A. Basten, R. Loblay, E. Chia, R. Callard und H. Pritchard-Briscoe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 99 (1977

38. H.N. Claman, S.D. Miller und J.W. Moorhead, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 105 (1977)

39. E. Kölsch, R. Stumpf und G. Weber, Transplant. Rev. 26, 56 (1975)

40. Z.A. Cohn, Adv. Immunol. 9, 164 (1968)

41. G.J.V. Nossal, Ann. Rev. Med. 18, 81 (1967)

42. M. Feldmann, A. Rosenthal und P. Erb, Int. Rev. Cytol. 60, 149 (1979)

43. A.S. Rosenthal, M.A. Barcinski und L.J. Rosenwasser, Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 37, 79 (1978)

44. E.R. Unanue, Adv. Immunol. 15, 95 (1972)

45. P.E. Lipsky und A.S. Rosenthal, J. Exp. Med. 141, 138 (1975

46. D.E. Mosier, J. Exp. Med. 129, 351 (1969)

47. D.D. Wood, J. Immunol. 123, 2395 (1979)

48. E.M. Hersh und J.E. Harris, J. Immunol. 100, 1184 (1968)

49. P. ERb und M. Feldmann, Eur. J. Immunol. 5, 759 (1976)

50. A.S. Rosenthal, P.E. Lipsky und E.M. Shevach, Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 34, 1743 (1975)

51. H.G. Opitz, H. Lemke und G. Hewlett, Immunol. Rev. 40, 53 (1978)

52. I. Gery, R.K. Gershon und B.H. Waksman, J. Exp. Med. 136, 128 (1972)

53. D.L. Rosenstreich und S.B. Mizel, Immunol. Rev. 40, 102 (1978)

54. O. Mäkela, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32, 423 (1968)

55. G.J.V. Nossal und O. Mäkela, J. Immunol. 88, 604 (1962)

56. E.S. Golub: Die Immunantwort, Springer-Verlag Berlin- Heidelberg- New York 1982

57. R. Keller: Immunologie und Immunpathologie, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart-New York 1981

58. J. Decker und E. Sercarz, Amer. Zool. 15, 189 (1978)

59. G.J.V. Nossal, B.L. Pike, J.W. Stocker, J.E. Layton und J.W. Goding, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 237 (1977)

60. J.J. Marchalonis, J.L. Atwell und D. Haustein, Biochem. Biophys. Acta 351, 99 (1974)

61. W. Heinzel und W. Voelter, Chemiker Zeitg. 105, 291 (1981)

62. G. Brown und M.F. Greaves, Eur. J. Immunol. 4, 235 (1974)

63. J.M. Dwyer, Progr. Allergy 21, 178 (1976)

64. J.F.A.P. Miller, Science 144, 1544 (1964)

65. N.K. Jerne, Eur. J. Immunol. 1, 1 (1971)

66. J.F. Bach und C. Carnaud, Progr. Allergy 21, 342 (1976)

67. R.R.A. Coombs und D. Franks, Progr. Allergy 13, 174 (1969)

68. D.H. Katz und B. Benacerraf, Adv. Immunol. 15, 1 (1972)

69. J.H.L. Playfair, Clin. Exp. Immunol. 8, 839 (1971)

70. G.W. Siskind und B. Benacerraf, Adv. Immunol. 10, 1 (1969)

71. B. Kindred und C. Schreffler, J. Immunol. 109, 940 (1972)

72. J.F.A.P. Miller und G.F. Mitchell, Transplant Rev. 1, 3 (1969)

73. R.W. Dutton, R. Falkhoff, J.A. Hirst, M. Hoffman, J.W. Kappeler, J.R. Kettman, J.F. Lesley und D. Vaun, Progr. Immunol. 1, 355 (1971)

74. A. Schimpl und E. Wecker, J. Exp. Med. 137, 547 (1973)

75. A. Schimpl und E. Wecker, Nature New Biol. 237, 15 (1972)

76. H. Wagner, J. Exp. Med. 138, 1379 (1974)

77. H. Cantor und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 141, 1390 (1975)

78. M.D. Cooper, R.D.A. Peterson und R.A. Good, Nature 205, 143 (1965)

79. R.K. Gershon, Contemp. Top. Immunobiol. 3, 1 (1974)

80. P.J. Baker, Transplant. Rev. 26, 3 (1975)

81. R.W. Dutton, Transplant. Rev. 26, 39 (1975)

82. B.F. Haynes und A.S. Fauci, J. Immunol. 118, 2281 (1977)

83. T. Tada, M. Taniguchi und T. Takemori, Transplant. Rev. 26, 107 (1975)

84. D.L. Pavy und C.W. Pierce, J. Exp. Med. 140, 356 (1974)

85. R.K. Gershon und K. Kondo, Immunol. 21, 903 (1971)

86. H. Cantor und R. Asofsky, J. Exp. Med. 131, 225 (1970)

87. H. Warnatz, Excerpta Med. (Amst.) 178, 232 (1971)

88. W.W. Bullock, D.H. Katz und B. Benacerraf, J. Exp. Med. 142, 275 (1976)

89. S.S. Rich und R.R. Rich, J. Exp. Med. 142, 1391 (1976)

90. H. Wagner, J. Exp. Med. 138, 1523 (1974)

91. S.S. Rich, R.R. Rich und D.L. Kastner, J. Reticuloend. Soc. 24, 217 (1978)

92. H. Cantor und E.A. Boyse, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 23 (1977)

93. B. Huber, O. Devinsky, R.K. Gershon und H. Cantor, J. Exp. Med. 143, 1534 (1976)

94. T. Tada und K. Okumura, Adv. Immunol. 28, 1 (1979)

95. D.H. Katz, M.E. Dorf und B. Benacerraf, J. Exp. Med. 140, 290 (1974)

96. J.M.D. Plate, Nature 260, 329 (1976)

97. C.A. Janeway, S.D. Shauow und E. Simpson, Nature 253, 544 (1975)

98. L.A. Herzenberg, K. Okumura, H. Cantor, V.L. Sato, F.W. Shen und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 144, 330 (1976)

99. M.A. Vadas, J.F.A.P. Miller, J.F.C. McKenzie, S.M. Chism, F.W. Shen, E.A. Boyse, J.R. Gamble und A.M. Whitelaw, J. Exp. Med. 144, 10 (1976)

100. H. Cantor, F.W. Shen und E.A. Boyse, J. Exp. Med. 143, 1391 (1976)

101. S. Barandum, K. Stampfli, G.A. Spengler, G. Riva, H. Albrecht, P. Girardet, W. Hitzig, P. Meister, G. von Muralt, H.R. Plöss, R. Tobler und R. Zeerleder, Helv. Med. Acta 26, 163 (1959)

102. I. Roitt: Immunologie, Steinkopff Verlag, Darmstadt 1977

103. A.C. Allison und A.M. Demnan. Brit. Med. Bull. 32, 124 (1976)

104. D. Grob, Ann. N.Y. Acad. Sci. 247, 218 (1976)

105. F.P. Siegal, M. Siegal und R.A. Good, J. Clin. Invest. 58, 109 (1976)

106. B.C. Broom. E.G. de la Concha, A.D.B. Webster, G.J. Janossy und G.L. Asheron, Clin. Exp. Immunol. 23, 73 (1976)

107. F. Aiuti, V. Schirrmacher, P. Ammirati und F. Fiorilli, Clin. Exp. Immunol. 20, 499 (1975)

108. D.W. Wara und A.J. Ammann, Transplant. Proc. 10, 203 (1978)

109. D.W. Wara und A.J. Ammann, Pediatrics 57, 643 (1976)

110. M.A. Di George, Birth Defects, 4, 116 (1968)

111. F. Aiuti und H. Wigzell: Thymus, Thymic Hormones and T-Lymphocytes, Acad. Press, New York 1980

112. F.D. Lindström, W.R. Hardy, B.J. Eberle und R.C. Williams, Ann. Int. Med. 78, 837 (1973)

113. H. Mellstedt und G. Holm, Clin. Exp. Immunol. 15, 309 (1973)

114. S.M. Hillinger und G.P. Herzig, J. Clin. Invest. 61, 1620 (1978)

115. J.J. Twomey, A.H. Laughter, S. Farrow und C.C. Deublass, J. Clin. Invest. 56, 467 (1975)

116. J. Lindström, Adv. Immunol. 27, 1 (1979)

117. S. Horowitz, W. Borcherding, A.V. Moorthy, R. Chesney, H. Schulte-Wissermann, R. Honn und A.L. Goldstein, Science 197, 999 (1977)

118. H.C. Thomas, M. Freni, J. Sanchez-Tapias, D. DeVilliers, S. Jain und S. Sherlock, Clin. Exp. Immunol. 26, 222 (1976)

119. T. Iwata, G.S. Infecy, S. Cunningham-Rundles, C. Cunningham-Rundles, E. Smithwick, N. Geller, R. O'Reilly und R.A. Good, Amer. J. Med. 71, 385 (1981)

120. F. Fiorilli, M.C. Siriani, F. Pandolfi, J. Quinti, U. Toshi, F. Aiuti und G. Goldstein, Clin. Exp. Immunol. 45, 344 (1981)

121. R. Zairovet, I. Varsano, R. Vegel, J. Cohen, B. Shoat, V. Rotter und N. Trainin, Biomed. 27, 105 (1977)

122. M.M. Zatz, T.L.K. Low und A.L. Goldstein: in "Biological Responses in Cancer", Vol. 1 (E. Mihich, ed.), Plenum Publishing Corp. New York (1982), S. 219

123. L.H. Calabrese, J.F. Bach, T. Currie, D. Vidt, J. Clough und R.S. Krakauer, Arch. Int. Med. 141, 253 (1981

124. A. Cooper und J.V. Wells, Austr. New Zealand J. Med. 11, 277 (1981)

125. J. Newsom-Davis, N. Willcox und L. Calder, New Engl. J. Med. 305, 1313 (1981)

126. M. Fiorilli, M.C. Siriani, F. Pandolfi, L.P. Pucillo, T. Letta und F. Aiuti, Thymus 4, 1 (1982)

127. M.F. Martelli, A. Velardi, P. Rambotti, C. Cernetti, A.M. Bracaglia, E. Ballatori und S. Davis, Cancer 49, 245 (1982)

128. D. Cupissol, A. Reg, A.L. Goldstein, B. Serron, J. Natl. Cancer Inst. 69, 27 (1982)

129. A.S. Klein und J. Shoham, Cancer Res. 41, 3217 (1981)

130. M.A. Hardy, M. Zisblatt, N. Levine. A.L. Goldstein, F. Lilly und A. White, Transplant. Proc. 3, 926 (1971)

131. M. Zisblatt, A.L. Goldstein, F. Lilly und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 66, 1170 (1970)

132. S.D. Lipson, P.B. Chretien, R. Makuch, P.E. Kenady und M.H. Cohen, Cancer 43, 863 (1979)

133. F. Bistoni, P. Marconi, L. Frati, E. Bonmassar und E. Garaci, Infect. Immunity 36, 609 (1982)

134. P. Bordigoni, M.C. Bene, J.F. Bach, G. Faure, M. Dardenne, J. Duheille und D. Olive, Lancet 2, 293 (1982)

135. E.G. Davies und R.J. Levinsky, Pediatric Res. 16, 573 (1982)

136. E.G. Davies, R.J. Levinsky, D.R. Webster, H.A. Simmonds und D. Perrets, Clin. Exp. Immunol. 50, 303 (1982)

137. F. Aiuti, P. Ammirati, M. Fiorilli, R. D'Amelio, F. Franchi M. Calvani und L. Businco, Pediatric Res. 13, 797 (1979)

138. A.L. Goldstein, A. Guha, M.M. Zatz, M. Hardy und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1800 (1972)

139. J.F. Bach, M. Dardenne, A.L. Goldstein, A. Guha und A. White, Proc. Natl. Acad. Sci. 68, 2734 (1971)

140. A.L. Goldstein, A. Guha, M.L. Howe und A. White, J. Immunol 106, 773 (1971)

141. J.A. Hooper, M.C. McDaniel, G.B. Thurman, G.H. Cohen, R.S. Schulof und A.L. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 125 (1975)

142. N. Trainin und M. Small, J. Exp. Med. 132, 885 (1970)

143. G.B. Thurman, A. Ahmed, D.M. Strong, M.E. Gershwin, A.D. Steinberg und A.L. Goldstein, Transplant. Proc. 7, 299 (1975)

144. P.H. Naylor, H. Sheppard, G.B. Thurman und A.L. Goldstein, Biochem. Biophys. Res. Comm. 73, 843 (1976)

145. N.H. Pazmino, J.N. Ihle und A.L. Goldstein, J. Exp. Med. 147, 708 (1978)

146. A.L. Goldstein, T.L.K. Low, M. McAdoo, J. McClure, G.B. Thurman, J.L. Rossio, C.Y. Lai, D. Chang, S.S. Wang, C. Harvey, A.H. Ramel und J. Meienhofer, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 725 (1977)

147. D. Wara, D.J. Barrett, A.J. Ammann und M.J. Cowan, Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 128 (1979)

148. P.B. Chretien, S.D. Lipson, R.W. Makuch, D.E. Kenady und M.H. Cohen, Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 135 (1979)

149. I. Goldschneider, A. Ahmed, F.J. Bollum und A.L. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2469 (1981)

150. T.L.K. Low, G.B. Thurman, C. Chincarini, J.E. McClure, G.D. Marshall, S.K. Hu und A.L. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 332, 34 (1979)

151. C. Birr, U. Stollenwerk, O. Brodner und H.G. Manke, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360, 1129 (1979)

152. C. Birr und U. Stollenwerk, Angew. Chem. 91, 422 (1979)

153. T.W. Wong und R.B. Merrifield, Biochemistry 19, 3233 (1980)

154. S.S. Wang, I.D. Kulesha und D.P. Winter, J. Amer. Chem. Soc. 101, 253 (1979)

155. S.S. Wang, R. Makofenske, A.E. Bach und R.B. Merrifield, Int. J. Pept. Protein Res. 15, 1 (1980)

156. T. Abiko, I. Onodera und H. Sekino, Chem. Pharm. Bull. 28, 3542 (1980)

157. R. Wetzel, H.L. Heynker, D.V. Goeddel, P. Jhurani, J. Shapiro, R. Crea, T.L.K. Low, J.E. McClure, G.B. Thurman und A.L. Goldstein, 251 (1982)

158. Michalewsky, T.F. Gabriel, D.P. Winter, R. Makofenske, W. Dauhe, J. Shively, K. Biemann und J. Meienhofer, Int. J. Pept. Protein Res. 21, 93 (1983)

159. J. Rey-Campos, M. Rey-Mendez und M. Freire, Int. J. Biochem. 15, 155 (1983)

160. C. Birr, U. Stollenwerk, O. Brodner und H.G. Manke, in: Structure and Activity of Natural Peptides. (W. Voelter u. G. Weitzel, eds.), S. 337, Walter de Gruyter, Berlin New York 1981

161. T.L.K. Low, G.B. Thurman, M. McAdoo, J. McClure, J.L. Rossio, P.H. Naylor und A.L. Goldstein, J. Biol. Chem. 254, 981 (1979)

162. T.L.K. Low und A.L. Goldstein, J. Biol. Chem. 354, 987 (1979)

163. T.L.K, Low, S.K. Hu und A.L. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 1162 (1981)

164. E. Hannappel, S. Davoust und B.L. Horecker, Bioch. Biophys. Res. Comm. 104, 266 (1982)

165. S.S. Wang, B.S.H. Wang, J.K. Chang, T.L.K. Low und A.L. Goldstein, Int. J. Pept. Protein Res. 18, 413 (1981)

166. E. Hannappel, G.J. Xu, J. Morgan, J. Hempstead und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 2172 (1982)

167. G.J. Xu, E. Hannappel, J. Morgan, J. Hempstead und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 4006 (1982)

168. T.L.K. Low, S.S. Wang und A.L. Goldstein, Biochem. 22, 733 (1983)

169. J.F. Bach und M. Dardenne, Cell. Immunol. 6, 394 (1973)

170. J.F. Bach, M. Dardenne und M.A. Bach, Transplant. Proc. 5, 523 (1973)

171. J.F. Bach und M. Dardenne, Immunol. 25, 353 (1973)

172. J.F. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau und M.A. Bach, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, (1975)

173. M. Dardenne, J.M. Pleau, N.K. Man und J.F. Bach, J. Biol. Chem. 252, 8040 (1977)

174. J.M. Pleau, M. Dardenne, Y. Blouquit und J.F. Bach, J. Biol. Chem. 252, 8045 (1977)

175. J.C. Monier, M. Dardenne, J.M. Pleau, D. Schmitt, P. Deschaux und J.F. Bach, Clin. Exp. Immunol. 42, 470 (1980)

176. M. Dardenne, J.M. Pleau, J.Y. Blouquit und J.F. Bach, Clin. Exp. Immunol. 42, 477 (1980)

177. D. Schmitt, J.C. Monier, M. Dardenne, J.M. Pleau und J.F. Bach, Thymus 4, 221 (1982)

178. J.F. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau und J. Rosa, J. Compt. Rend. AcaD: Sci. (Paris) 283D, 1605 (1976)

179. J.A. Bash, M. Dardenne, J.F. Bach und B.H. Waksman, Cell. Immunol. 26, 308 (1976)

180. J.F. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau und J. Rosa, Nature 266, 55 (1977)

181. G.S. Infecy, M. Dardenne, J.F. Bach und R.A. Good, Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 38, 1212 (1979)

182. D.B. Kaufman, Clin. Exp. Immunol. 39, 722 (1980)

183. J.M. Pleau, M. Dardenne und J.F. Bach, Mol. Cell. Bioch. 41, 67 (1981)

184. J. Martinez, D. Blanot, G. Auger, A. Sasaki und E. Bricas, Int. J. Pept. Protein Res. 16, 267 (1980)

185. E. Bricas, J. Martinez, D. Blanot, G. Auger, M. Dardenne, J.M. Pleau und J.F. Bach in Peptides, Proc. of the 5th American Peptid Symposium (M. Goodman u. J. Meienhofer, eds.) S. 564, J. Wiley a. Sons, New York 1977

186. Y.P. Wan und K. Folkers, Bioorg. Chem. 8, 35 (1979)

187. D. Blanot, J. Martinez, G. Auger und E. Bricas, Int. J. Pept. Protein Res. 14, 41 (1979)

188. D. Blanot, J. Martinez, A. Sasaki, G. Auger, E. Bricas, M. Dardenne und J.F. Bach in Peptides, Proc. of the 6th American Peptid Symposium (E. Gross und J. Meienhofer, eds.) S. 551, Pierce Chemical Company, 1979

189. R.G. Strachan, W.J. Palaveda, S.J. Bergstrand, R.F. Nutt, F.W. Holly und D.F. Veber, J. Med. Chem. 22, 586 (1979)

190. N. Trainin und M. Linker-Israeli, Cancer Res. 27, 309 (1967)

191. A.I. Kook, Y. Yakir und N. Trainin, Cell. Immunol. 19, 151 (1975)

192. N. Trainin und M. Small, J. Exp. Med. 132, 885 (1970)

193. N. Trainin, A.I. Kook, T. Umiel und M. Albala, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 349 (1975)

194. N. Trainin, M. Small und A. Globerson, J. Exp. Med. 130, 765 (1969)

195. V. Rotter und N. Trainin, Cell. Immunol. 16, 413 (1974)

196. T. Umiel und N. Trainin, Eur. J. Immunol. 5, 85 (1975)

197. V. Rotter, A. Globerson, I. Nakamura und N. Trainin, J. Exp. Med. 138, 130 (1973)

198. Y. Yakir, A.I. Kook und N. Trainin, J. Exp. Med. 148, 71 (1978)

199. A.I. Kook und N. Trainin, J. Exp. Med. 139, 193 (1974)

200. R. Falchetti, G. Bergesi, A. Eshkol, C. Cafiero, L. Adorini und L. Caprino, Drugs Exp. Clin. Res. 3, 39 (1977)

201. G. Bergesi und R. Falchetti, Allerg. Immun. Clin. 24, 204 (1977)

202. A. Astaldi, G.C.B. Astaldi, P.T.A. Schellekens und V.P. Eijsvoogel, Nature 260, 713 (1976)

203. P. Wijermans, G.C.B. Astaldi, A. Facchini, P.T.A. Schellekens und A. Astaldi, Biochem. Biophys. Res. Comm. 86, 88 (1979)

204. G.C.B. Astaldi, A. Astaldi, M. Groenewond, P. Wijermans, P.T.A. Schellekens und V.P. Eijsvoogel, Eur. J. Immunol. 7, 836 (1977)

205. A.M. Kruisbeek, G.C.B. Astaldi, M.J. Blankwater, I.J.Ziljlstra, L.A. Levert und A. Astaldi, Cell. Immunol. 35, 145 (1978)

206. K. Folkers, N. Sakura, T. Kubiak und H. Stepien, Biochem. Biophys. Res. Comm. 97, 595 (1980)

207. K. Folkers, T. Kubiak, H. Stepien und N. Sakura, Biochem. Biophys. Res. Comm. 97, 601 (1980)

208. K. Folkers, H. Stepien, T. Kubiak, N. Sakura und S. Sakagami, Biochem. Biophys. Res. Comm. 98, 115 (1981)

209. P.A. Tovo, M.G. Bernengo, L. Cordero di Montezemolo, A. del Piano, M. Saitta und P. Nicola, Thymus 2, 41 (1980)

210. J.F. Bach, M.A. Bach, M. Dardenne, J.M. Pleau, P. Lefrancier, J. Choay, D. Blanot und E. Bricas in Polypeptid Hormones (R.F. Beers und E.G. Bassett, eds.) S. 489, Raven Press, New York 1980

211. A. Astaldi, G.C.B. Astaldi, P. Wijermans, A. Facchini, T. van Bemmel, C.J.M. Leupers, P.T.A. Schellekens und V.P. Eijsvoogel in Polypeptid Hormones S. 501, siehe Lit. 210

212. G. Goldstein, Nature 247, 11 (1974)

213. R.S. Basch und G. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1474 (1974)

214. D.H. Schlesinger und G. Goldstein, Cell. 5, 361 (1975)

215. T. Audhya, D.H. Schlesinger und G. Goldstein, Biochemistry 20, 6195 (1981)

216. D.H. Schlesinger, G. Goldstein, M.P. Scheid und E.A. Boyse, Cell 5, 367 (1975)

217. G. Goldstein und C.Y. Lau in Polypeptide Hormones S. 459, siehe Lit. 210

218. C.Y. Lau und G. Goldstein, J. Immunol. 124, 1861 (1980)

219. C.Y. Lau, J. Freestone und G. Goldstein, J. Immunol. 125, 1634 (1980)

220. M.E. Gershwin, W. Kruse und G. Goldstein, J. Rheumatol. 6, 610 (1979)

221. H. Verhaegen, W. DeCock, J. DeCree und G. Goldstein, Thymus 1, 195 (1980)

222. M.E. Weksler, J.B. Innes und G. Goldstein, J. Exp. Med. 148, 996 (1978)

223. G. Goldstein, M.P. Scheid, E.A. Boyse, D.H. Schlesinger und J. van Wauwe, Science 204, 1309 (1979)

224. M. Fujino, S. Shinagaw, T. Fukuda, M. Takaoki, H. Kawaji und Y. Sugino, Chem. Pharm. Bull 25, 1486 (1977)

225. E.G. Bliznakov, Y. Wan, D. Chang und K. Folkers, Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 631 (1978)

226. M.P. Scheid, G. Goldstein und E.A.Boyse, J. Exp. Med. 147, 1727 (1978)

227. E. Hannappel, S. Davoust und B.L. Horecker, Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 1708 (1982)

228. R.S. Basch und G. Goldstein, Ann. N.Y. Acad. Sci. 249, 291 (1975)

229. J.P. Tischio, J.E. Patrick, H.S. Weintraut, M. Chasin und G. Goldstein, Int. J. Pept. Protein Res. 14, 479 (1979)

230. R. Hirschmann und F.D. Veber in: "The Chemistry of Polypeptides, Essays in Honor of Leonidas Zervas", G. Katsoyannis, ed., Plenum Press, New York, S. 125 (1973)

231. T. Curtius, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 35, 3226 (1902)

232. E. Schnabel, Liebigs Ann. 659, 168 (1962)

233. G.W. Anderson, J.E. Zimmermann und F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 98, 5013 (1976)

234. W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970)

235. F. Weygand, D. Hoffmann und E. Wünsch, Z. Naturforsch. 21 b, 426 (1966)

236. M. Bergmann und L.Zervas. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)

237. O. Nishimura und M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. 24, 1568 (1976)

238. L.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 79, 98 (1957)

239. R. Schwyzer und H. Kappeler, Helv. Chim. Acta 46, 1550 (1963)

240. H. Kalbacher und W. Voelter, Angew. Chemie 90, 998 (1978)

241. C. Birr, Liebigs Ann. 763, 162 (1972)

242. E. Schröder, Liebigs Ann. 670, 127 (1963)

243. F.M. Callahan und G.W. Anderson, J. Amer. Chem. Soc. 85, 201 (1963)

244. F.M. Callahan und G.W. Anderson, J. Amer. Chem. Soc. 82, 3359 (1960)

245. H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromat. Sci. 15, 174 (1977)

246. H. Kalbacher, Dissertation, Universität Tübingen 1980

247. N.L. Benoiton, K. Kuroda und F.M.F. Chen, Int. J. Peptide Res. 13, 403 (1979)

248. A. Arendt, A.M. Kolodziejczyk und T. Sokolowska, Pol. J. Chem. 52, 1959 (1977)

249. Y.S. Klausner und M. Bodanszky, Synthesis 453 (1972)

250. M. Goodman, P. Keogh und H. Anderson, Bioorganic Chemistry 6, 239 (1977)

251. R.S. Rapaka, R.S. Bhatnagar und D.E. Nitecki, Biopolymers 15, 1585 (1976)

252. W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 106, 3626 (1973)

253. M. Bodanszky, N. Chandramouli und J. Martinez, J. Med. Chem. 22, 270 (1979)

254. J. Honzl und J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Comm. 26, 2333 (1961)

255. Y.S. Klausner und M. Bodanszky, Synthesis 549 (1974)

256. H. Horn, Dissertation, Universität Tübingen 1981

257. J. Pless und R.A. Boisonnas, Helv. Chim. Acta 46, 1609 (1963)

258. H. Horn, persönliche Mitteilung

259. C. Beni, persönliche Mitteilung

260. G. Jäger und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 1227 (1970)

261. P.G. Munder, T. Stiefel, K.H. Widmann und K. Theurer, Onkologie 5, 1 (1982)

262. A.R. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv. Chim. Acta 44, 2022 (1961)

263. F. Reindel und W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954)

264. C.J. Weber, J. Biol. Chem. 86, 217 (1930)

265. J.A. Riddick und W.B. Bunger, Organic Solvents, Physical Properties and Methods of Purification, New York 1970

266. W. Heinzel, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1980

267. W. König und R. Geiger, Cherm. Ber. 103, 788 (1970)

268. M.S. Morgan und L.H. Cretcher, J. Amer. Chem. Soc. 70, 375 (1948)

269. E. Schröder, Liebigs Ann. 692, 241 (1966)

270. M. Kinoshita und H.Klostermeyer, Liebigs Ann. 696, 226 (1966)

271. M. Brenner und R.W. Pfister, Helv. Chim. Acta 34, 2085 (1951)

272. E. Wünsch und J. Jentsch, Chem. Ber. 97, 2490 (1964)

273. M. Bergmann und L. Zervas. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 65, 1192 (1932)

274. W.D. John und G.T. Young, J. Chem. Soc. 2870 (1954)

275. E. Schröder und E. Klieger, Liebigs Ann. 673, 208 (1964)

276. J.W. Scott, D. Parker und P.R. Parrish, Synth. Comm. 11, 303 (1981)

277. E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 3305 (1964)

278. L. Zervas und C. Hamaladis, J. Amer. Chem. Soc. 87, 99 (1965)

279. W. Heinzel, T. Kronbach und W. Voelter, Z. Naturforsch. 37b, 1652 (1982)

280. G.W. Anderson, J.E. Zimmermann und F.M. Callahan, J. Amer. Chem. Soc. 86, 1839 (1964)

281. E. Wünsch und A. Zwick, Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 333, 108 (1963)

282. H. Otsuka, K. Inouye, M. Kanayama und F. Shinokazi, Bull. Chem. Soc. Jap. 39, 882 (1966)

283. R. Schwyzer und W. Rittel, Helv. Chim. Acta 44, 159 (1961)

284. S. Guttmann, Helv. Chim. Acta 44, 721 (1961)

285. H. Kalbacher und W. Voelter, J. C. S. Chem. Comm. 1265 (1980)

286. K. Vogler und P. Lanz, Helv. Chim. Acta 43, 270 (1960)

287. E. Schröder und H. Gibian, Liebigs Ann. 656, 190 (1962)

288. E. Schröder, Liebigs Ann. 670, 127 (1963)

289. K.B. Mathur, H. Klostermeyer und H. Zahn, Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 346, 60 (1966)

290. R.A. Boissonas, Helv. Chim. Acta 38, 1491 (1955)

291. E. Wünsch, F. Dres und J. Jentsch, Chem. Ber. 98, 803 (1965)

292. S. Goldschmidt und C. Jutz, Chem. Ber. 86, 1116 (1953)

293. H. Gibian und E. Klieger, Liebigs Ann. 640, 145 (1961)

294. E. Klieger und H. Gibian, Liebigs Ann. 655, 200 (1962)

295. E. Klieger und H. Gibian, Liebigs Ann. 655, 195 (1962)

296. M. Itoh, Chem. Pharm. Bull. Jap. 18, 784 (1970)

Curriculum vitae

Name:	Wolfgang Heinzel
Geburtstag, -ort:	27.09.1952, Tailfingen
Familienstand:	verheiratet, 2 Kinder
Schulbesuch:	
1959-1963	Volksschule Gauselfingen
1963-1971	Staatliches Gymnasium Hechingen
Bundeswehr:	
01.07.1971 - 30.06.1973	Wehrdienst bei der Luftwaffe
Studium:	
WS 1973/74	Immatrikulation für Chemie an der Universität Karlsruhe
WS 1974/75	Immatrikulation für Chemie an der Universität Tübingen
Januar 1980 - September 1980	Diplomarbeit: "Untersuchungen zu Nebenreaktionen bei acidolytischer Schutzgruppenabspaltung tryptophanhaltiger Peptide"
Dezember 1980 - März 1983	Praktischer Teil der Doktorarbeit: "Klassische Synthesen von Thymopoietin (32-36) und Thymosin β9 (18-29)" unter der Leitung von Prof. Dr. W. Voelter im Institut für Organische Chemie und im Institut für Physiologische Chemie der Universität Tübingen
seit April 1982	Assistent im chemischen Praktikum für Mediziner, Zahnmediziner und Biochemiker

Meine akademische Ausbildung verdanke ich den Herren Professoren W. Buckel, E.-U. Franck, G. Fritz, K. Krogmann (Karlsruhe), E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Gauglitz, G. Häfelinger, H.-P. Hagenmeier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, U. Kunze, I.-P. Lorenz, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, G. Pausewang, H. Pauschmann, W. Rundel, M. Sauerbier, M. Schramm, F.F. Seelig, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter und W. Zeil (Tübingen)